



Sveučilište u Zagrebu

PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET
BIOLOŠKI ODSJEK

Ana Savić Mlakar

**ULOGA PROUPALNIH I PROTUUPALNIH
MEHANIZAMA U RAZVOJU
REZISTENCIJE POSREDOVANE ABC
TRANSPORTERIMA U UPALNIM
BOLESTIMA CRIJEVA**

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2015.



University of Zagreb

FACULTY OF SCIENCE
DIVISION OF BIOLOGY

Ana Savić Mlakar

**THE ROLE OF PROINFLAMMATORY
AND ANTI-INFLAMMATORY
MECHANISMS IN DEVELOPMENT OF
ABC TRANSPORTER MEDIATED
RESISTANCE IN INFLAMMATORY
BOWEL DISEASES**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2015.

Ovaj je doktorski rad izrađen na Imunološkom zavodu d.d., Odjel za istraživanje i razvoj, Odsjek za celularnu imunologiju, Zagreb, Hrvatska, pod vodstvom dr.sc. Ivne Svobode-Beusan i dr.sc. Kreše Bendelje, u sklopu Sveučilišnog dokorskog studija Biologije na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

ZAHVALA

Zahvaljujem svim zaposlenicima Odjela za istraživanje i razvoj Imunološkog zavoda, koji su pomogli u izvršavanju ovog istraživanja. Veliko hvala mojim mentorima na savjetima i stpljenju, te svim liječnicima i osoblju u suradničkim kliničkim ustanovama koji su sudjelovali u prikupljanju uzoraka i kliničkih podataka. Zahvaljujem i svojim roditeljima, bratu i baki na podršci i razumijevanju.

Ovu disertaciju posvećujem svojoj obitelji, Mariu i Gabrielu, koji su mi najveća podrška i inspiracija.

Ana Savić Mlakar

**ULOGA PROUPALNIH I PROTUUPALNIH MEHANIZAMA U RAZVOJU
REZISTENCIJE POSREDOVANE ABC TRANSPORTERIMA U UPALNIM
BOLESTIMA CRIJEVA**

ANA SAVIĆ MLAKAR

Ovaj rad izrađen je na Imunološkom zavodu, Zagreb, Hrvatska

SAŽETAK

ABC transporteri sudjeluju u očuvanju crijevne barijere, te utječu na biodostupnost lijekova. Promjene njihove ekspresije mogu doprinijeti narušavanju barijere i razvoju upale, kao što je slučaj u upalnim bolestima crijeva. Njihova uloga u patogenezi upalnih bolesti crijeva nije u potpunosti razjašnjena. U ovom istraživanju odredili smo ekspresiju triju transportera: MDR1, MRP1 i BCRP, kod odraslih i djece oboljele od Crohnove bolesti (odrasli; n=25, djeca; n=26) i ulceroznog kolitisa (odrasli; n=27, djeca; n=20). Paralelno smo odredili i ekspresiju proupalnih citokina interferona (IFN)- γ , interleukina (IL)-2, IL-6, IL-1 β i IL-17A, kao i njihove negativne regulatore, SOCS1 i SOCS3. Ispitanici su podijeljeni u četiri grupe: neliječeni bolesnici dijagnosticirani *de novo*, grupa bolesnika pod terapijom, te grupa u remisiji odnosno grupa zdrave kontrole (odrasli; n=10, djeca; n=15). Ovo istraživanje pokazuje izmijenjene ekspresije transportera koji koreliraju s povišenim ekspresijama citokina u oboljelih ispitanika. Nadalje, povišena ekspresija proupalnih citokina, popraćena povišenim ekspresijama njihovih negativnih regulatora, potvrđuju upalni proces kao dominantni patološki mehanizam u upalnim bolestima crijeva. Dakle, promjene ekspresija ABC transportera mogle bi imati funkcionalnu važnost u progresiji bolesti i liječenju.

Ključne riječi: ABC transporteri; Crohnova bolest; Ulcerozni kolitis; citokini; supresori citokinske signalizacije

Mentori: dr.sc. Ivna Svoboda-Beusan i dr.sc. Krešo Bendelja

Ocjenjivači: prof.dr.sc. Nada Oršolić, prof.dr.sc. Branko Troskot, prof.dr.sc. Maja Matulić

University of Zagreb

Doctoral thesis

Faculty of Science

Division of Biology

**THE ROLE OF PROINFLAMMATORY AND ANTI-INFLAMMATORY
MECHANISMS IN DEVELOPMENT OF RESISTANCE MEDIATED BY ABC
TRANSPORTERS IN INFLAMMATORY BOWEL DISEASES**

ANA SAVIĆ MLAKAR

This work has been performed at the Institute of immunology, Zagreb, Croatia

ABSTRACT

Efflux transporters are crucial for the maintenance of gut homeostasis and influence drug bioavailability. Changes in their expression can disrupt the barrier which consequently results with inflammatory response, as observed in inflammatory bowel diseases (IBD). Their exact role in IBD pathogenesis is inconclusive. We have measured the expression of transporters MDR1, MRP1 and BCRP in pediatric and adult patients with Crohn's disease (adults; n=25, pediatric; n=26) and ulcerative colitis (adults; n=27, pediatric; n=20). In parallel, we have assessed the expression of inflammatory cytokines IFN- γ , IL-2, IL-6, IL-1 β and IL-17A, as well as their negative regulators, SOCS1 and SOCS3. Subjects were grouped as: newly diagnosed/untreated, active disease/treated, remission and controls (adults; n=10, pediatric; n=15). We showed that altered expression of efflux transporters correlated with cytokine expressions in IBD patients compared to controls. Furthermore, high cytokine expression, followed by high expression of their matched negative regulators, confirmed inflammatory process as the dominant pathological mechanism in IBD. In conclusion, alterations in ABC transporter expression could have functional importance in disease progression and treatment.

Keywords: ABC transporters; Crohn's disease; Ulcerative colitis; cytokines; suppressors of cytokine signalling

Supervisors: Ivna Svoboda-Beusan, Ph.D. and Krešo Bendelja, Ph.D.

Reviewers: Professor Nada Oršolić, Ph.D., Associate Professor Branko Troskot, Ph.D., Associate Professor Maja Matulić, Ph.D.

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
2. LITERATURNI PREGLED.....	2
2.1. UPALNE BOLESTI CRIJEVA.....	2
2.2. EPIDEMIOLOGIJA UPALNIH BOLESTI CRIJEVA.....	4
2.3. ETIOLOGIJA UPALNIH BOLESTI CRIJEVA	5
2.3.1. Okolišni čimbenici.....	5
2.3.2. Imunosni čimbenici.....	5
2.3.3. Genetički čimbenici.....	7
2.4. CITOKINI I MOLEKULE SOCS	7
2.4.1. Interleukin-6.....	8
2.4.2. Interferon gama.....	9
2.4.3. Interleukin-1 beta.....	9
2.4.4. Interleukin-17A.....	10
2.4.5. Interleukin-2.....	10
2.4.6. SOCS1.....	11
2.4.7. SOCS3.....	12
2.5. LIJEČENJE UPALNIH BOLESTI CRIJEVA	12
2.6. VIŠESTRUKA REZISTENCIJA NA LIJEKOVE.....	13
2.7. ABC TRANSPORTERI.....	14
2.7.1. Struktura ABC transportera.....	15
2.7.2. Mehanizam izbacivanja supstrata.....	16
2.7.3. MDR1	17
2.7.4. MRP1.....	20
2.7.5. BCRP.....	20

3. OBRAZLOŽENJE TEME I HIPOTEZA.....	22
4. MATERIJALI I METODE.....	23
4.1. Ispitanici i uzorci.....	23
4.2. Stabilizacija tkiva.....	24
4.3. Homogenizacija tkiva.....	24
4.4. Izolacija ukupne RNA.....	25
4.5. Reverzna transkripcija RNA.....	25
4.6. Kvantitativna lančana reakcija polimeraze.....	26
4.7. Statistička obrada podataka.....	27
5. REZULTATI.....	29
5.1. Karakteristike ispitanika.....	29
5.2. Ekspresija ABC transportera.....	32
5.2.1. Ekspresija ABC transportera kod odraslih.....	32
5.2.2. Ekspresija ABC transportera kod djece.....	34
5.3. Odnos ekspresija ABC transportera između oboljelih od upalnih bolesti crijeva i zdravih ispitanika.....	35
5.3.1. Analiza ekspresije ABC transportera kod odraslih.....	35
5.3.2. Analiza ekspresije ABC transportera kod djece.....	38
5.4. Odnos ekspresija citokina i molekula SOCS između oboljelih od upalnih bolesti crijeva i zdravih ispitanika.....	41
5.4.1. Analiza ekspresije citokina i molekula SOCS kod odraslih.....	41
5.4.2. Analiza ekspresije citokina i molekula SOCS kod djece.....	44
5.5. Praćenje tijeka liječenja bolesnika s ulceroznim kolitisom.....	49
5.5.1. Slučaj 1.....	50
5.5.2. Slučaj 2.....	51

6. RASPRAVA.....	54
7. ZAKLJUČAK.....	66
8. LITERATURA.....	67
9. ŽIVOTOPIS.....	92
10. PRILOG 1: -POPIS KRATICA.....	93

1. UVOD

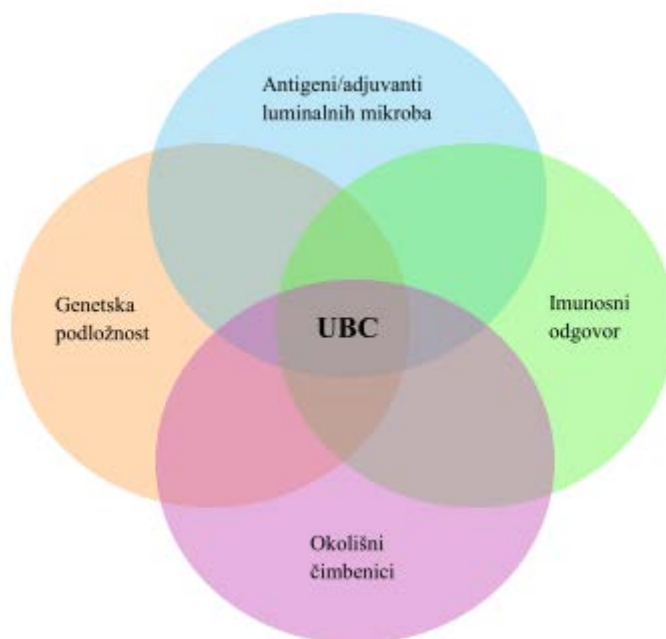
Transporteri koji vežu ATP (ABC transporteri; od engl. *ATB binding cassette transporters*) membranski su transporteri uključeni u očuvanje crijevne barijere tako što izbacuju potencijalno štetne tvari van stanice koristeći energiju dobivenu iz hidrolize molekule ATP-a. Upravo zbog te svoje funkcije utječu i na biodostupnost lijekova [1, 2], te njihova povećana aktivnost i/ili ekspresija doprinosi razvoju višestruke rezistencije na lijekove [3]. Jedni od najbolje opisanih ABC transportera, koji utječu na pojavu višestruke rezistencije na lijekove, su MDR1, MRP1 i BCRP. Njihova aktivnost, kao i njihov izražaj [4], opisani su i u upalnim bolestima crijeva (UC), no međutim, njihov točan doprinos razvoju same bolesti nije u potpunosti razjašnjen [5–7]. UC obuhvaćaju dvije bolesti, Crohnovu bolest (CB) i ulcerozni kolitis (UK). Obje bolesti okarakterizirane su pojačanom proizvodnjom citokina Th1 (CB) i Th2 (UK), iako rezultati ne potvrđuju jasnu podvojenost između navedenih bolesti. Nedavno je pokazano da u patogenezi obiju etiologija upalnih bolesti crijeva važnu ulogu imaju citokini Th17 [8]. Kako UC predstavljaju sve veći problem moderniziranoga svijeta, potpunije poznavanje njihove patogeneze, u smislu određivanja ekspresija i uloge transportera odnosno citokina u različitim fazama bolesti, kao i ranom nasuprot kasnom razvoju bolesti, je od velike važnosti.

Cilj ovog istraživanja je odrediti razlikuje li se ekspresija *MDR1*, *MRP1* i *BCRP*, te relevantnih proupalnih citokina i njihovih negativnih regulatora, između odraslih i djece oboljele od UC-a i odgovarajućih zdravih kontrola, te utvrditi mijenjaju li se njihove ekspresije ovisno o stadiju bolesti. Ovi podaci bi mogli pokazati da li postoje razlike između ranog (djeca) i kasnog (odrasli) početka razvoja bolesti te kakav je odnos između ABC transportera i citokina u različitim stadijima bolesti. Ekspresija ispitivanih transportera i medijatora upale biti će određena na razini mRNA metodom lančane reakcije polimeraze u stvarnom vremenu. Pretpostavljamo da se ekspresija transportera razlikuje između oboljelih i kontrola, kao i u različitim fazama bolesti, što posljedično može utjecati na biodostupnost lijekova koji se koriste u liječenju te dodatno doprinijeti pogoršanju upale propuštajući potencijalno štetne tvari kroz crijevnu stjenku.

2. LITERATURNI PREGLED

2.1. UPALNE BOLESTI CRIJEVA

Upalne bolesti crijeva (engl. *Inflammatory bowel diseases*, IBD) predstavljaju grupu kroničnih upalnih bolesti čija su dva glavna oblika Crohnova bolest i ulcerozni kolitis. Za otprilike 10% slučajeva ne može se sa sigurnošću reći kojem obliku UBC-a pripadaju, pa se takvi slučajevi opisuju kao međuoblici UBC-a [9, 10], iako je pokazano da se većina takvih slučajeva ipak razvije u ulcerozni oblik [10]. Sama patologija bolesti nije u potpunosti razjašnjena, ali najnovija otkrića ukazuju na to da je bolest rezultat nekoliko čimbenika koji su međusobno isprepleteni [11, 12]. Pad tolerancije na lokalne komenzalne bakterije dovodi do pokretanja imunosnog odgovora koji je u genetski podložne osobe prekomjeran te dolazi do pretjerane proizvodnje citokina čime se upala dodatno pogoršava. To ukazuje da okolišni i imunološki čimbenici sinergistički dovode do razvoja bolesti u genetski podložnoj osobi (Slika 1.).



Slika 1. Međureakcija različitih čimbenika koji doprinose razvoju kronične upale u UBC-u. Preuzeto i prilagođeno prema Sartor i sur.[13]

Pokazano je da lokalno dolazi do povećane produkcije proupalnih citokina [14] i kemokina [15] koji doprinose progresiji bolesti. Važnu ulogu u tom procesu imaju profesionalne antigen predočne stanice kao što su dendritičke stanice (DC, od engl. *Dendritic cells*) koje mogu produžiti svoje izdanke kroz čvrste spojeve među epitelnim stanicama crijeva (engl. *tight junctions*) i na taj način „okusiti“ sadržaj lumena, te M stanice (od engl. *microfold cells*) koje prenose antigene iz lumena crijeva preko epitela do DC. Štoviše, epitelne stanice crijeva imaju karakteristike antigen predočnih stanica (APC, od engl. *Antigen-presenting cell*), budući da uz receptore NOD (od engl. *Nucleotide-binding oligomerization domain*) i TLR (od engl. *Toll-like receptors*) na svojoj površini mogu eksprimirati i molekule MHC (od engl. *Major histocompatibility complex*) II [16].

Najčešći simptomi oba oblika bolesti su nagli gubitak težine, bolovi u trbuhu, učestale meke stolice s primjesama krvi i sluzi, čija učestalost varira s obzirom na težinu bolesti, te temperatura, umor i iscrpljenost. No, oba oblika bolesti se patološki i imunološki razlikuju.

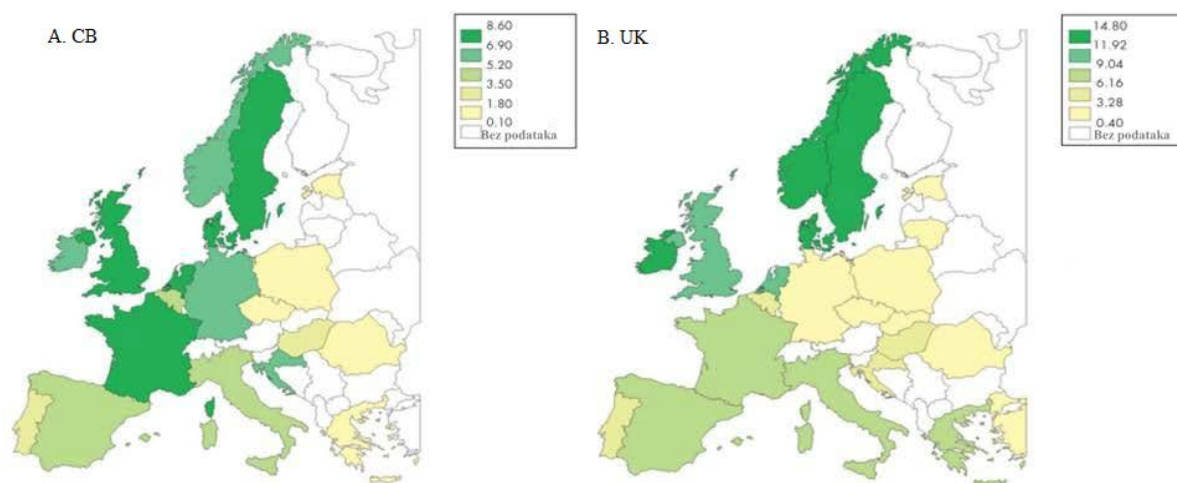
CB može zahvatiti bilo koji dio probavnog sustava, dakle od usta do anusa, s time da je najčešće zahvaćeno mjesto upale terminalni ileum zbog čega se bolest često naziva terminalni ileitis. Upala je transmuralna, tj. zahvaća cijelu debljinu crijevne stijenke s varijabilnim stupnjem zahvaćenosti debelog crijeva i pojavljuje se na mahove. Karakteriziraju je stvaranje otvora u stjenkama crijeva (perforacije), nastanak abnormalnih prolaza i komunikacija između dvaju organa koje u normalnim uvjetima nisu vezani (fistule), suženje probavnog sustava (strikture), te prisutstvo granuloma i ektranodalnih agregata limfocita u dubljem sloju crijevnog tkiva (lamini propriji). Iako je bolest vrlo točno opisana još 1913. godine, ime je dobila 1932. nakon što su Crohn, Ginsberg i Oppenheimer opisali ileitis kao bolest različitu od crijevne tuberkuloze [17].

Za razliku od CB-a, UK najčešće zahvaća rektum (proktitis), ali kod većine bolesnika širi se i proksimalno te uključuje i čitavo debelo crijevo (pankolutis). Upala je površinska i kontinuirana [18], a histološka karakteristika bolesti je narušavanje arhitekture kripti, absces kripti, ulceracija, infiltracija limfocita, plazma stanica i polimorfonuklearnih granulocita. UK je prvi puta opisan 1859. godine [19].

S obzirom na simptome, CB i UK je u samome početku vrlo lako zamijeniti sa simptomima gripe ili upale slijepog crijeva. Konačna dijagnoza bolesti može se postaviti tek nakon specijaliziranih dijagnostičkih pretraga poput endoskopije, ultrazvuka i kolonoskopije.

2.2. EPIDEMIOLOGIJA UPALNIH BOLESTI CRIJEVA

Upalne bolesti crijeva najčešće se pojavljuju između 15-te i 30-godine života kod oba spola, iako se mogu pojaviti u bilo koje vrijeme. Manje od 10% slučajeva oboljenja javlja se kod osoba mlađih od 18 godina. Ipak, postoji razlika u dobi pojavljivanja pojedinog oblika bolesti crijeva. Kod UK-a je to najčešće u četvrtom, a kod CB-a u trećem desetljeću života. Pojavnost kod UK-a je nešto veća kod muškaraca, dok je za CB zabilježena neznatno veća pojava kod žena. Sama pojava UBC-a veća je u sjevernijim, industrijaliziranim zemljama i to puno češće kod bijelaca [20]. Međutim, novija istraživanja ukazuju na smanjenje razlika pojavnosti ovih bolesti među različitim rasnim ili etničkim podgrupama [21]. Pojavnost UK-a i CB-a je različita te je zabilježeno da u slučaju UK-a ona varira između 0,5–24,5/100.000 ljudi, a kod CB-a između 0,1–16/100.000 ljudi širom svijeta. U Europi je pojava za UK 11,2/100.000, a u slučaju CB-a 5,9/100.000 ljudi. Omjer UK-a prema CB-u je otprilike 2:1. Najranije istraživanje u Hrvatskoj koje je ispitalo pojava UBC-a provedeno je 1980-ih i pokazalo je učestalost od 0,7/100.000 za CB i 1,5/100.000 stanovnika za UK [22, 23]. **Slika 2.** pokazuje raspodjelu pojavnosti CB-a i UK-a u Europi.



Slika 2. Pojavnost CB-a (A) i UK-a (B) na 100.000 u Europi. Preuzeto i prilagođeno iz Frangos i sur. [24]

2.3. ETIOLOGIJA UPALNIH BOLESTI CRIJEVA

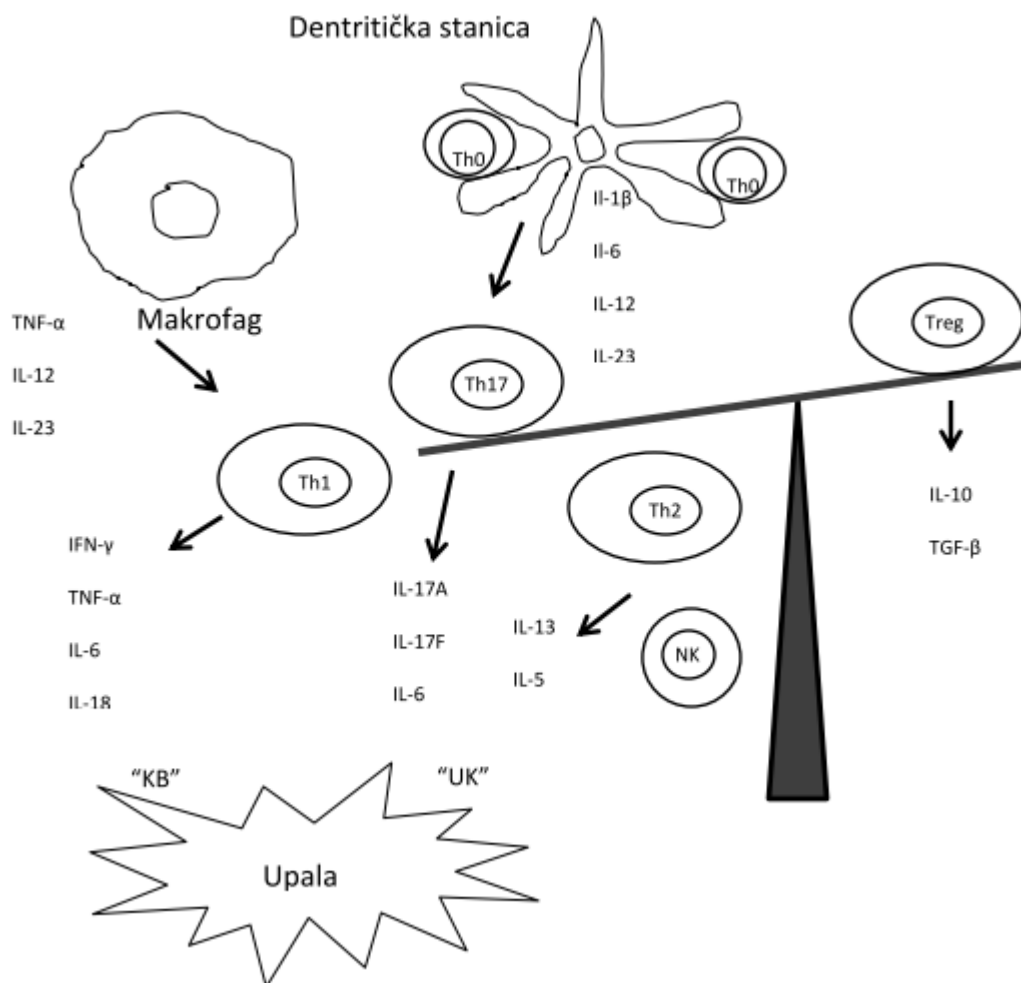
Na razvoj upalnih bolesti crijeva utječu okolišni i imunosni čimbenici u genetski podložnoj osobi.

2.3.1. Okolišni čimbenici

Okolišni čimbenici uključuju pušenje, oralne kontracepcijske lijekove, prehranu, infekcije u ranom djetinjstvu i društveno-ekonomski status. Međutim, ispostavilo se da je pušenje jedini čimbenik koji ima stvaran učinak na razvoj UBC-a, sa suprotnim učincima na razvoj UK-a i CB-a. Dok je kod CB-a pušenje povezano s razvojem bolesti [25] i utječe na kvalitetu života oboljelih [26], kod UK-a pokazuje zaštitnu ulogu koja se pripisuje učincima nikotina [27, 28]. Kao mogući pokretači razvoja UBC-a predlagani su razni virusi, poput virusa ospica [29, 30], paraziti i bakterije, no jednoznačni dokazi koji bi upućivali na njihovu povezanost s patogeneзом nedostaju. Više pozornosti, kao mogućem čimbeniku u razvoju CB-a, posvećivalo se *Mycobacterium paratuberculosis*, no i u ovom slučaju nije dokazan njezin učinak na etiologiju bolesti [31]. Slično je i za invazivni soj bakterije *Escherichia coli* s adhezivnim svojstvima (AIEC, od engl. *adherent-invasive escherichia coli*), koja je pronađena u bolesnicima s UK-om, ali ne i zdravim ispitanicima [32].

2.3.2. Imunosni čimbenici

Za održavanje normalne homeostaze crijeвне sluznice važno je očuvanje epitelne barijere, ali i ravnoteža mukoznog imunosnog sustava. Narušavanje bilo jednog ili drugog dovodi do rušenja epitelne barijere te razvoja upale što može rezultirati pojavom upalnih bolesti crijeva [33, 34]. Budući da su crijeva pod konstantnim antigenim pritiskom komezala odnosno patogena, antigena iz hrane itd, mukozni imunosni sustav mora odigrati dvije vrlo važne uloge kako bi očuvao homeostazu crijeva. Prva je da mora omogućiti imunosni odgovor na antigene patogena s ciljem njihove eliminacije, a drugi je da istodobno mora tolerirati antigene komezala i nutritivne antigene. Upravo zbog toga, mukozni imunosni sustav je u stalnom aktiviranom stanju, s time da se to većinom odnosi na sposobnost stišavanja upalnih reakcija.



Slika 3. Neravnoteža citokina između efektorskih i regulatornih T stanica u UBC-u. Prilagođeno prema Sanchez-Muñoz i sur. [35]

U tu svrhu mukozni imunosni sustav je razvio različite strukture koje sudjeluju u razvoju imunosnog odgovora. Payerove ploče predstavljaju mjesto susreta antigena i naivnih T stanica. Antigeni mogu proći epitelnu barijeru bilo uhvaćeni od strane DC-a ili kroz specijalizirane stanice, tzv. M stanice. Uz epitelne stanice i M stanice, razlikujemo još i goblett stanice koje su važne u proizvodnji mucina ključnog za izbacivanje većih patogena iz crijeva. Izolirani limfoidni folikuli Payerovih ploča predstavljaju limfoidno tkivo povezano sa crijevom, tzv. GALT (od engl. *Gut associated lymphoid tissues*). Razlikujemo i laminu propriju koja zajedno s epitelnim slojem čini sluznicu crijeva, te mezenterijalne limfne čvorne (MLN od engl. *Mesenteric lymph nodes*) za koje se pokazalo da imaju ključnu ulogu u pokretanju oralne tolerancije [36]. Histopatološki, UK i CB okarakterizirani su povećanom infiltracijom limfocita, granulocita i plazma stanica te neravnotežom između regulacijskih i

pomoćničkih limfocita T koji su odgovorni za proizvodnju citokina specifičnih za pojedini tip imunskog odgovora (Th1, Th2 i Th17 tip odgovora) (**Slika 3.**). Tako se Crohnova bolest najčešće opisuje kao „bolest Th1“ s povišenim razinama IL-12 i IFN- γ [37–39], dok je UK „Th2-sličan“ budući da je zamijećena povišena proizvodnja citokina IL-5 i IL-13 ali ne i IL-4. No otkrićem citokina limfocita Th17, koncept opisivanja UBC-a kao Th1 nasuprot Th2 doveden je u pitanje, budući da je otkriveno da su oni uključeni u patogenezu životinjskih modela UBC-a [40]. Također, istraživanja pokazuju da postoji preklapanje u profilima ekspresija citokina između CB-a i UK-a, s povišenim mRNA razinama IL-1 β i IL-6 [41]. Čimbenici i mehanizmi koji bi mogli biti odgovorni za nekontroliranu aktivaciju limfocita T u obje bolesti nisu u potpunosti poznati, ali smatra se da je značajan upravo gubitak tolerancije prema komezalnim antigenima koji je vjerojatno prouzrokovan neravnotežom između proupalnih i regulatornih molekula, gubitkom pravilne regulacije od strane limfocita T što rezultira njihovom prekomjernom aktivacijom i proliferacijom [42]. Dodatno, postoje i promjene u profilu limfocita B što se očituje u prekomjernoj produkciji uglavnom IgG, ali i IgA i IgM [43]. UBC se ponegdje opisuje i kao autoimune bolesti budući da su u nekim slučajevima zamijećena antitijela protiv antigena citoplazme neutrofila (ANCA, od engl. *Anti-neutrophil cytoplasmic antibodies*) [44], s time da su ona više povezana s UK-om nego s CB-om. Kod UK bolesnika pronađeno je i anti-tropomiozin protutijelo čiji epitopi mogu križno reagirati s bakterijskim produktima i izazvati aktivaciju komplementa preko IgG1 [45, 46] ukazujući na aktivaciju mehanizama urođene i stečene imunosti u UBC-u.

2.3.3. Genetički čimbenici

Genetski čimbenici imaju važnu ulogu u razvoju upalnih bolesti crijeva. Poznato je da je kod rodbine bolesnika oboljelih od UBC-a povećana predispozicija za razvoj bolesti. Ta pojavnost je puno češća kod CB-a nego kod UK-a što bi značilo da je genetska predispozicija puno izraženija kod CB-a. Genetska je povezanost dodatno potvrđena istraživanjima na jedno- i dvojajčanim blizancima kojima je pokazano da jednojajčani blizanci imaju veću vjerojatnost pojave bolesti [47, 48] pri čemu je jasno naglašena uloga okolišnih čimbenika.

2.4. CITOKINI I MOLEKULE SOCS

Citokini su ključni posrednici odgovarajućih fizioloških funkcija unutar probavnog i imunskog sustava. Kod bolesnika s UBC-om pokazana je povišena produkcija IL-6, IL-1 β , IL-18 i čimbenika tumorske nekroze alfa (TNF- α , od engl. *tumor necrosis factor alpha*) [49]. Njihova signalizacija je pod strogom negativnom kontrolom molekula SOCS (od engl.

Suppressor of cytokine signalling), porodice unutarstaničnih proteina [50–52] koja se sastoji od 8 članova: CIS i SOCS1-7. Svaka molekula ima centralnu SH2 domenu i amino-terminalnu domenu varijabilne duljine i slijeda, kao i karboksi-terminalnu SOCS kutiju [53]. Signaliziranje preko citokinskih receptora na površini stanice dovodi do aktivacije signalne kaskade koja rezultira ulaskom molekula STAT (od engl. *Signal transduction and activator of transcription*) u jezgru te poticanja transkripcije ciljnih gena među kojima su i molekule SOCS. Molekule SOCS, dakle, sudjeluju u negativnoj povratnoj sprezi citokinske signalizacije.

2.4.1. Interleukin-6

IL-6 je višefunkcionalni citokin uključen u regulaciju različitih fizioloških i patoloških događaja, poput razvoja granulocita [54], diferencijacije limfocita T [55] i nastanka autoimunih bolesti [56]. Kod UBC-a ima ključnu ulogu u preživljavanju limfocita T i rezistencije na apoptozu. Brojne infekcije mogu potaknuti njegovu ekspresiju, kao i neki proupalni citokini poput IL-1 β i TNF- α . Glavni izvor IL-6 predstavljaju mononuklearne stanice lamine proprije (LPMNC, od engl. *lamina propria mononuclear cells*) [57]. Aktivacija stanica posredstvom IL-6 dovodi do prijenosa signala bilo preko receptora IL-6R na površini malog broja stanica, koji se sastoji od dviju podjedinica (IL-6R i gp130) ili u najvećem broju slučajeva (kao i u UBC-u) preko solubilne molekule sIL-6R (od engl. *Soluble IL-6 receptor*) u procesu koji se naziva „trans-signalling. U tom slučaju sIL-6R veže IL-6, te se IL-6/sIL-6R kompleks može vezati za gp130 na stanicama koje ne eksprimiraju IL-6R i koje zbog toga inače ne bi reagirale na IL-6. Studija provedena na miševima bez ekspresije supresora SOCS3^{-/-} (od engl. *knock-out*) pokazala je važnost IL-6 u promoviranju akutne letalne i kronične upalne bolesti, ali da ne djeluje sam, već da je potrebna i signalizacija drugih uzvodnih i paralelnih citokinskih puteva koji su bilo pod izravnom ili neizravnom regulacijom SOCS3 [58]. Budući da IL-6 pokazuje širok spektar aktivnosti, potrebna je pojačana kontrola njegove produkcije i signalizacije za vrijeme upale. Kod UBC-a zamijećena je njegova povišena razina u serumu [59–61] i u crijevima oboljelih [62], koja korelira s aktivnosti bolesti [63]. Istraživanje provedeno na uzorcima djece oboljele od UBC-a pokazalo je poveznicu povišenih razina IL-6 i težine bolesti, kao i da su razine IL-6 nešto više kod CB-a nego UK-a [60]. Također, njegova razina u serumu mogla bi poslužiti kao svojevrsan prediktor UBC-a kod pedijatrijskih bolesnika [64]. Povećana proizvodnja IL-6 zamijećena je i na neupalnim/inaktivnim oblicima UBC-a, pretežno kod CB-a [65]. Neki podatci upućuju na mogućnost uporabe razine IL-6 u serumu kao biljega za kontrolu remisije,

što potvrđuje korelacija visokih serumskih razina IL-6 i učestalosti relapsa. Njegova uloga u patofiziologiji i kliničkoj važnosti jako je dobro opisana [66], a jedan od primjera je eksperimentalni model kolitisa putem prijenosa CD4 limfocita T iz oboljelih miševa u imunodeficijentne miševe SCID (od engl. *severe combined immunodeficiency*), prilikom čega dolazi do razvoja kolitisa ovisnog o IL-6 [67]. S obzirom na širok spektar uloga koje IL-6 ima kod UBC-a, kao jedan od mogućih terapeutika za ovu bolest predlažu se blokatori IL-6/STAT3 signalnog puta, kao i protutijela za IL-6R.

2.4.2. Interferon gama

IFN- γ tipičan je proupalni citokin koji ima brojne funkcije poput antiviralne aktivnosti, povećanja ekspresije molekula MHC I te stimulacije limfocita T i stanica NK [68]. Izravno utječe na povećanje membranske propusnosti (permeabilnost) mijenjajući epitelne čvrste spojeve [69]. Aktivacija urođene imunosti od strane patogena, posredovana ligandima TLR, dovodi do indukcije IFN- γ [70] koji doprinosi zaštiti domaćina, ali može imati i imunopatogene učinke. Pokazano je da IFN- γ porijeklom iz CD4 limfocita T igra važnu ulogu u gubitku Panethovih stanica, odgovornih za produkciju antimikrobnih peptida, za vrijeme mikrobne infekcije [71]. Također, za vrijeme upale u CB-u dolazi do značajne infiltracije limfocita T karakteriziranih visokom proizvodnjom IFN- γ [37, 39]. Povećana proizvodnja IFN- γ zamijećena je i u životinjskim modelima UBC-a poput kolitisa induciranog dekstran sulfatom (DSS, engl. *dextran sulfate sodium*) [72]. Dodatna potvrda njegove ključne uloge u patologiji kolitisa induciranog s DSS-om proizlazi iz studije provedene na IFN- γ ^{-/-} miševima koji su pokazali smanjenu upalu crijeva [73].

2.4.3. Interleukin-1 β

IL-1 β je višestruko funkcionalan proupalni citokin za kojeg je pokazano da stimulacijom crijevnih fibroblasta na proizvodnju enzima za razgradnju matriksa dovodi do gubitka cjelovitosti crijeвне sluznice i pojave ulceracija [74]. Uloga IL-1 β u patogenezi upalnih bolesti crijeva potvrđena je u nekoliko istraživanja na bolesnicima, [75–77], te u životinjskim modelima kolitisa gdje njegova povišena koncentracija u sluznici korelira s inicijacijom i amplifikacijom crijeвне upale. Glavni izvor IL-1 β kod upalnih bolesti crijeva su stanice mijeloidne loze, u prvom redu monociti/makrofagi [78]. IL-1 β , s TNF- α , sinergistički povećava permeabilnost endotelnih i epitelnih stanica, čime doprinosi pojačavanju upale. Važan kontrolni mehanizam aktivnosti IL-1 β predstavlja endogeni IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) za kojeg je pokazano da sudjeluje u održavanju homeostaze

crijeva [79]. Kod aktivnog oblika UK-a primijećen je povišen omjer IL-1 β /IL-1Ra [80], iz čega je moguće zaključiti da je IL-1Ra jedan od mehanizma utišavanja upalnih reakcija [81]. Uz činjenicu da je neophodan za promociju diferencijacije limfocita Th17 [82–84], IL-1 β pospješuje i lokalno nakupljanje CD4 limfocita T i urođenih limfocita (ILC, engl. innate lymphoid cells) koji proizvode IL-17A [85].

2.4.4. Interleukin-17A

IL-17A pretežno stvaraju limfociti Th17, iako se pokazalo da ga tijekom kronične upale mogu stvarati čak i CD8 limfociti T [86]. Funkcionira kao ključni posrednik u imunosnim reakcijama odgođenog tipa time što povećava produkciju kemokina i novači monocite i neutrofile na mjesto upale [87]. IL-17A potiče sazrijevanje DC *in vitro* putem povećanja ekspresije kostimulatornih molekula i njihove sposobnosti stimulacije limfocita T [88]. IL-17A je posrednik upalnih procesa u različitim tkivima te je pokazano da potiče ekspresiju nekoliko gena usko povezanih s upalom, poput IL-6, faktora stimulacije kolonije granulocita i makrofaga (GM-CSF, engl. *Granulocyte/macrophage-colony stimulating factor*) i unutarstanične adhezijske molekule-1 (ICAM-1, engl. *Intracellular adhesion molecule 1*) [89–93]. Uz to, pojačava upalne odgovore inducirane pomoću IL-1 β i TNF- α [94, 95]. IL-17A se povezuje uz nekoliko imunosnih poremećaja poput multiple skleroze, reumatoidnog artritisa, sistemske skleroze, sistemskog lupusa, bronhijalne astme itd., ali njegova uloga u UBC-u nije još u potpunosti razjašnjena [96–100]. Tako je njegova poveznica s UK-om prilično sporna i neka istraživanja ukazuju na njegovu proupalnu ulogu u životinjskim modelima kolitisa [101, 102], dok druga predlažu da bi mogao imati čak zaštitnu ulogu [103]. Kod bolesnika s upalnim bolestima crijeva pronađene su povišene razine IL-17A u serumu i upalnom tkivu crijeva [104–109].

2.4.5. Interleukin-2

IL-2 je pleiotropni citokin, te je ujedno i prvi čimbenik rasta limfocita T čiji je gen kloniran [110]. Stvaraju ga aktivirani CD4 limfociti T, iako je zabilježena njegova ekspresija i od strane naivnih CD8 limfocita T, dendritičkih stanica i stanica timusa [111–114]. Važan je za staničnu smrt induciranu aktivacijom (engl. *activation-induced cell death*; AICD), razvoj regulatornih limfocita T, kao i za razvoj citotoksičnih CD8 limfocita T, sekundarno širenje memorijskih CD8 limfocita T te moduliranje diferencijacije pomoćničkih limfocita T. Ključan je za pojačavanje ekspresije IL-4R α [115] i IL-12R β 2 [116], uz IL-2R α i IL-2R β , ali i za smanjivanje ekspresije gp130 [116], čime modulira signale posredovane citokinima IL-2,

IL-4, IL-12 i IL-6, tj. sudjeluje pri diferencijaciji citokinskog odgovora limfocita Th1, Th2, Treg i Th17. IL-2, dakle, pojačava ili atenuira signalne puteve potrebne za diferencijaciju u različite tipove pomoćničkih limfocita T, te ovisno o citokinskom okruženju nakon stimulacije antigenom, djeluje kao glavni regulator diferencijacije stanica [117]. Regulira ekspresiju T-bet te tako potiče diferencijaciju Th1, ali i koči diferencijaciju limfocita Th17. Djeluje kao glavna homeostatska molekula: kada ga je puno ukazuje na prekomjernu aktivaciju, a kada je nizak ukazuje na gubitak regulacije. Nađeno je da limfociti T iz periferne krvi bolesnika oboljelih od UBC-a imaju smanjenu proliferativnu sposobnost što je povezano sa smanjenjem proizvodnje IL-2 [118]. Međutim, lokalno u sluznici crijeva bolesnika s CB zabilježene su povišene razine IL-2 [119]. Ometanje signalnog puta posredovanog IL-2 smatra se dobrim pristupom liječenja UBC-a, budući da limfociti T u sluznici aktivne CB pokazuju povišenu ekspresiju mRNA IL-2 receptora [120, 121]. Pristup se sastoji u upotrebi monoklonskih protutijela za IL-2 receptore (CD25 beta-lanac) čime se blokira aktivacija limfocita i dolazi do smanjenja aktivnosti bolesti u životinjskom modelu kolitisa [122].

2.4.6. SOCS1

SOCS1 je otkriven na temelju sposobnosti blokiranja diferencijacije stanica mijeloidne leukemije u makrofage posredovane IL-6 [123], te njegove uloge u stižavanju citokinskih signalnih puteva [124, 125]. Ekspresiju SOCS1 induciraju brojni citokini, uključujući IFN- γ , IL-4, IL-6, LIF (od engl. *Leukemia inhibitory factor*) i EPO (od engl. *Erythropoietin*) *in vitro* ili *in vivo*, koji su ujedno ciljne molekule negativne regulacije [126]. Kinetika proizvodnje mRNA za SOCS1 nakon izlaganja citokinima dostiže vrhunac unutar 2 sata i vraća se na početnu razinu nakon 4 sata od početka stimulacije. Iako se miševi s nedostatkom gena za SOCS1 rađaju zdravi, umiru u ranoj dobi od kompleksnih hematoloških i patoloških poremećaja, poput ubrzane apoptoze limfocita u timusu, masne degeneracije jetre i infiltracije monocita u brojne organe, ukazujući na multifunkcionalnu supresorsku ulogu [127, 128]. U tankom i debelom crijevu SOCS1 je konstitutivno eksprimiran [129], međutim istraživanja u upalnom tkivu bolesnika s CB-om i UK-om nisu uočila razlike u ekspresiji SOCS1 naspram zdravih ispitanika [130]. SOCS1 igra važnu ulogu u imunosnoj homeostazi crijeva regulirajući aktivnost dendritičkih stanica posredstvom prostaglandina E2 (PEG2), kao i aktivnost makrofaga [131]. Prema tome nije iznenađujuće da SOCS1 sprječava razvoj kolitisa u životinjskim modelima gdje je patologija posredovana citokinima IL-4 i IFN- γ [132]. Pozitivna uloga SOCS1 nije samo rezultat aktivne blokade efektorskih mehanizama u

upalnim bolestima crijeva nego zajedno s drugim čimbenicima sudjeluje i u razvoju regulatornih limfocita T ([133]).

2.4.7. SOCS3

SOCS3 je, nakon SOCS1, najbolje proučen član porodice proteina SOCS. Sa SOCS1 dijeli nekoliko zajedničkih karakteristika, poput visoke aminokiselinske homologije i indukcije proizvodnje putem IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-10, GH (od engl. *Growth hormone*), LIF, EPO, TNF- α , IFN- γ , čije signalne puteve ujedno i inhibira. SOCS3 je povišeno eksprimiran u upaljenom tkivu kolona bolesnika s UBC-om, kao i kod životinjskih modela spontanog ili induciranog kolitisa [130, 134]. Lokalizacija njegove ekspresije na epitelnim te na hiperplastičnim epitelnim stanicama [130, 135] ukazuje na moguću ulogu u obnavljanju sluznice, ali i u ograničavanju jačine i trajanja hiperproliferacije kripti za vrijeme oporavka sluznice [126, 136]. Složena uloga SOCS3 u upalnim bolestima crijeva vjerojatno obuhvaća protu- i proupalne mehanizme posredovane citokinom IL-6 [137]. Naime, SOCS3 sudjeluje u biologiji limfocita Th17 na dvojak način, potencirajući njihov nastanak u suradnji s citokinima IL-23 i IL-1 β , odnosno inhibirajući proizvodnju IL-17A, vjerojatno preko prigušivanja fosforilacije Stat3, kao izravnog regulatora transkripcije IL-17A [138]. Nuklearna i citoplazmatska ekspresija SOCS3 značajno je povišena u tkivima s akutnom i kroničnom upalom, posebice u unovačenim populacijama leukocita [139]. Gubitak ekspresije SOCS3 u makrofagima izravno utječe na IL-6-ovisni put indukcije protuupalnog odgovora [140]. Smatra se da put IL-6/STAT3/SOCS3 igra važnu ulogu u regulaciji homeostaze crijevnih epitelnih stanica, te gubitak ravnoteže između ekspresije SOCS3 i IL-6/p-STAT3 signalizacije može uzrokovati upalu [141–143]. U prilog tome je i nalaz povišene ekspresije SOCS3 kod bolesnika s neaktivnim UK-om gdje predstavlja važan kontrolni mehanizam kroničnog upalnog procesa [144].

2.5. LIJEČENJE UPALNIH BOLESTI CRIJEVA

Glavni cilj liječenja upalnih bolesti crijeva je uklanjanje simptoma i poboljšanje kvalitete života. Pristup odabira terapije razlikuje se između UK-a i CB-a, ali se i unutar svake od ovih bolesti također razlikuje s obzirom na stupanj oboljenja. U tu svrhu koriste se razni antibiotici, imunosupresivi i imunomodulatori te monoklonska protutijela koja su usmjerena na neke od ključnih citokina i njihovu signalizaciju, poput Infliximaba, usmjerenog na TNF- α . Kortikosteroidi se koriste u liječenju obje bolesti u aktivnoj fazi, no međutim, 20% bolesnika s upalom crijeva je rezistentno na njih, a otprilike 30% bolesnika koji odgovore na

ovu terapiju razvijaju steroidnu ovisnost [145]. Kako će pojedini pacijent odgovoriti na danu terapiju ovisi o više čimbenika, a neki su: jačina bolesti i ozbiljnost komplikacija, okolišni i genetski čimbenici. Postoji vrlo velika varijabilnost u učinkovitosti odgovora na terapiju među populacijom. Na konačni ishod terapije, osim navedenih čimbenika, veliki učinak može imati i razvoj višestruke rezistencije na lijekove.

Antibiotici se upotrebljavaju kako bi se suzbila infekcija i time neizravno utjecalo na smanjenje upale. U slučaju blagog do umjerenog CB-a koriste se protuupalni lijekovi slični aspirinu (tzv. 5-ASA, 5-aminosalicilati), poput mesalamina, dok se u slučaju jake bolesti upotrebljavaju kortikosteroidi koji smanjuju upalu, blokiraju imunosni odgovor i dovode do remisije bolesti. Nedostatak uporabe kortikosteroida je taj što se smiju upotrebljavati kratkoročno, jer dugoročno steroidi mogu uzrokovati neželjene simptome, te su stoga neprikladni za održavanje remisije. U tu svrhu bolji su različiti imunosupresivni lijekovi koji koče urođenu i stečenu imunost (Imuran, Remicade itd.). U nekim slučajevima može doći do pojave rezistencije na neke od terapeutika [146]. U tim slučajevima potreban je kirurški zahvat kojim se pacijentu ukloni dio upalom zahvaćenog crijeva ili u težim slučajevima i čitavo crijevo.

Liječenje UK-a ovisi o tome koliko je bolest uznapredovala te najčešće uključuje različite terapeutike i promjene u načinu prehrane. Kao i kod CB-a, u nekim slučajevima je potrebno bolesnike podvrgnuti operaciji. U slučaju blagih simptoma predlaže se promjena u načinu prehrane, koriste se lijekovi protiv diareje, aminosalicilati ili steroidi. Kod umjerenih do jačih simptoma koriste se jače doze steroida s ciljem postizanja remisije bolesti, koja se onda održava uporabom aminosalicilata. U svrhu liječenja jakih kliničkih simptoma mogu se upotrijebiti i imunomodulatori kao i biološki lijekovi. Veliki problem u liječenju UBC-a predstavlja razvoj višestruke rezistencije na lijekove koja je posredovana, između ostaloga, i ABC transporterima.

2.6. VIŠESTRUKA REZISTENCIJA NA LIJEKOVE

Višestruka rezistencija na lijekove (engl. *Multidrug resistance*, *MDR*) predstavlja ozbiljnu prepreku u uspješnom liječenju bolesti. Karakterizira ju pojava rezistencije ne samo na tvar koja je rezistenciju potakla, već i na širok spektar strukturno i funkcionalno nezvanih tvari.

Postoje intrinzični i stečeni mehanizmi koji mogu doprinijeti nastanku rezistencije. Kod intrinzičnih mehanizama razlikujemo:

- čimbenike domaćina, poput smanjenog unutarstaničnog nakupljanja lijeka zbog slabe apsorpcije, brzog metabolizma ili izbacivanja lijeka ili pak kao kod tumorskih stanica zbog nedjelotvorne dopreme lijeka
- genetske i epigenetske promjene preko kojih može doći do promjena u staničnom ciklusu, signaliziranju ili apoptotskim putevima.

Stečeni mehanizmi podrazumijevaju: 1) promijenjeno nakupljanje lijekova unutar stanica bilo zbog povećanog izbacivanja lijeka (povećana ekspresija ABC transportera) ili zbog smanjenog unosa lijeka (neučinkovita endocitoza), 2) indukciju mehanizama detoksifikacije (povećani popravak DNA, aktivacija citokrom P450 oksidaza) te 3) neosjetljivost na apoptozu izazvanu lijekovima.

Višestruka rezistencija na lijekove u upalnim bolestima crijeva je također zapažena nakon terapije glukokortikoidima [146–148]. Kao mogući uzrok razvoja rezistencije u tom slučaju navodi se povišena ekspresija/aktivnost P-glikoproteinske (P-gp) pumpe budući da je na stanicama periferne krvi bolesnika s upalnim bolestima crijeva, koji ne odgovaraju na danu terapiju, zamijećena povišena ekspresija gena za *mdr1* [149].

2.7. ABC TRANSPORTERI

Transporteri koji vežu ATP predstavljaju najveću nadporodicu aktivnih transportera pokretanih ATP-om (engl. adenosine triphosphate) za iznos štetnih tvari. Koriste energiju dobivenu iz hidrolize ATP-a za fiziološku i detoksikološku ulogu u izbacivanju odnosno unosu tvari u stanicu. U prokariotskim stanicama imaju ulogu u unosu tvari, a kod eukariotskih funkcioniraju prvenstveno kao izbacivači.

Prvi put su otkriveni u prokariotskim stanicama *Escherichia coli* (*E. coli*) i *Salmonella typhimurium*. Unos nutrijenata u te bakterijske stanice ovisio je o periplazmatskim proteinima koji vežu supstrate i upotrebljavaju hidrolizu ATP-a za transport [150]. Prvi transporter otkriven u eukariota, zbog svoje uloge u višestrukoj rezistenciji na lijekove, bio je MDR1 (od engl. *Multidrug resistance protein 1*, ABCB1, P-gp) [151–154], a uslijedila su otkrića i drugih transportera povezanih s višestrukom rezistencijom na lijekove, MRP1 (od engl. *Multidrug-resistance associated protein 1*, ABCC1), te BCRP (od engl. *Breast cancer resistance protein*, ABCG2). Do danas je otkriveno ukupno 48 ABC transportera u ljudi koji

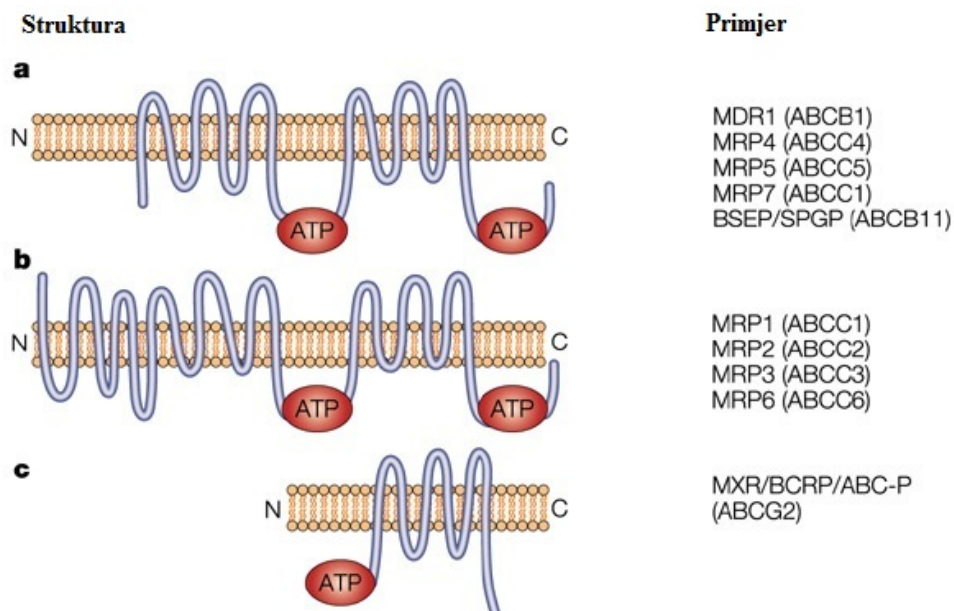
su podijeljeni u 7 podporodica (ABCA-ABCG). Struktura ovih transportera pokazuje visoku homologiju u sekvenci među različitim podporodicama. Općenito, sastoje se od 12 transmembranskih (TM) domena s dva unutarstanična mjesta za vezanje ATP-a. ABC transporteri u eukariota su smješteni u staničnoj membrani gdje funkcioniraju kao pumpe za izbacivanje štetnih tvari (engl. efflux).

Intenzivna istraživanja ABC transportera u tumorima pokazala su da visoka ekspresija rezultira rezistencijom na terapiju kao posljedice izbacivanja antitumorskih lijekova. Međutim, uz tumorske stanice, ovi transporteri su eksprimirani i na zdravim tkivima, najviše na onima s barijernom ili ekskretornom funkcijom, poput krvno-moždane barijere, bubrega, jetre ili crijeva. Njihova ekspresija u crijevima sustavno je analizirana na biopsijama različitih odsječaka probavnog sustava. Pojedini transporteri različito su eksprimirani od duodenuma do zavijenog crijeva. MDR1 je najviše eksprimiran u terminalnom ileumu, dok je ekspresija BCRP-a najveća u duodenumu i smanjuje se prema rektumu. Ekspresija MRP1 pokazuje najmanje varijacija unutar crijevnog sustava [4, 155]. Mutacije u ovim transporterima mogu dovesti do različitih genetskih bolesti, poput krvarenja jetre i poremećaja oka poput renitis pigmentose [156–158]. Budući da su mnogi lijekovi koji se koriste u liječenju UBC-a ujedno i supstrati P-glikoproteina i transportera BCRP-a i MRP1 te obzirom na njihovu ulogu u očuvanju funkcije crijevnih barijera, moguće je da su ovi transporteri uključeni u podložnost razvoju UBC-a.

2.7.1. Struktura ABC transportera

Tipičan ABC transporter sastoji se od dvije transmembranske domene (engl. *membrane-spanning domain*; MSD) i dvije citosolne domene koje vežu nukleotide (engl. *nucleotide-binding domain*, NBD). Postoje u obliku polutransportera (po jedna MSD i NBD) kojima je potrebna dimerizacija da bi postigli puni funkcionalni oblik (BCRP), ili su punog oblika i sadrže sve četiri domene u jednom peptidu (MDR1). Neki sadrže dodatnu transmembransku domenu (MRP1) (**Slika 4.**). MSD-ovi se sastoje od nekoliko transmembranskih heliksa, najčešće šest, koji su uključeni u vezanje supstrata, specifičnost i njegovo kretanje kroz staničnu membranu. Transmembranske domene se nastavljaju na unutarstanične petlje (engl. *intracellular loops*) koje stupaju u interakciju s domenama koje vežu nukleotide i pomažu u konformacijskim promjenama za olakšani transporta supstrata. Hidroliza ATP-a odvija se u NBD-ovima i pruža strukturalnu promjenu u MSD-u što pak omogućava transport preko lipidnog dvosloja. Domene koje vežu nukleotide sastoje se od

200-300 aminokiselina i visoko su konzervirane [159]. Sadrže dva konzervirana motiva, Walker A i B, koji su udaljeni 90-120 aminokiselina te C-petlju.



Slika 4. Struktura ABC transportera. Prikaz a) cjelovitog transportera, b) cjelovitog transportera s tri transmembranske domene, c) polu-transportera koji formiraju dimere. Preuzeto i prilagođeno prema Gottesmani i sur. [160].

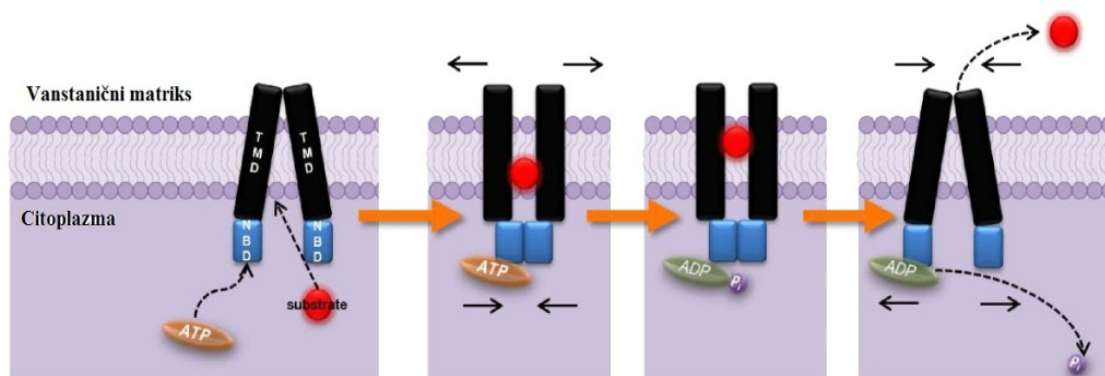
2.7.2. Mehanizam izbacivanja supstrata

Na temelju strukture ABC transportera i istraživanja provedenih u otkrivanju afiniteta P-glikoproteina, došlo se do predloženog modela mehanizma transporta, nazvanog „ATP-switch model“ [161]. Model upotrebljava prijelaz između niskog i visokog afinitetnog stanja vezanja supstrata, vezanog uz ATP katalitički ciklus. Čitav proces može se opisati u četiri koraka: vezanje supstrata, vezanje ATP-a i pomak supstrata, ATP hidroliza i povratak u konformaciju bez supstrata. Kada ATP nije vezan za domene koje vežu nukleotide, transporter ima otvorenu konformaciju i visoki afinitet prema supstratu. U toj konfiguraciji, dvije transmembranske domene su otvorene prema citosolu s domenama koje vežu nukleotide u otvorenoj konformaciji. Supstrati mogu prići vezujućem džepiću iz unutrašnjeg sloja membranskog dvosloja ili iz citosola [162]. To stvara hidrofilni džep unutar transportera za vezanje supstrata. Širok raspon supstrata proizlazi iz činjenice da gornja polovica vezujućeg džepa sadrži hidrofobne i aromatske ostatke, dok donja polovica sadrži više

polarnih ostataka [162]. Vezanjem supstrata dolazi do konformacijske promjene u domeni koja veže nukleotid prilikom čega se povećava afinitet prema ATP-u. Vezanjem ATP-a dolazi do zatvaranja domena koje vežu nukleotide u zatvoreni dimer. To zatvaranje dovodi do dovoljno velike konformacijske promjene u transmembranskim domenama čime se one grupiraju prema vanjskoj površini membrane uzrokujući translokaciju i izbacivanje supstrata iz stanice zbog smanjenog afiniteta. Povratak u otvorenu konformaciju iziskuje hidrolizu dviju molekula ATP-a [163]. Ova hidroliza dovodi do destabilizacije zatvorene konformacije domena koje vežu nukleotide i posljedičnog otpuštanja adenozin difosfata i fosfata čime se transporter vraća u otvorenu konformaciju podložnu ponovnom vezanju supstrata (**Slika 5.**).

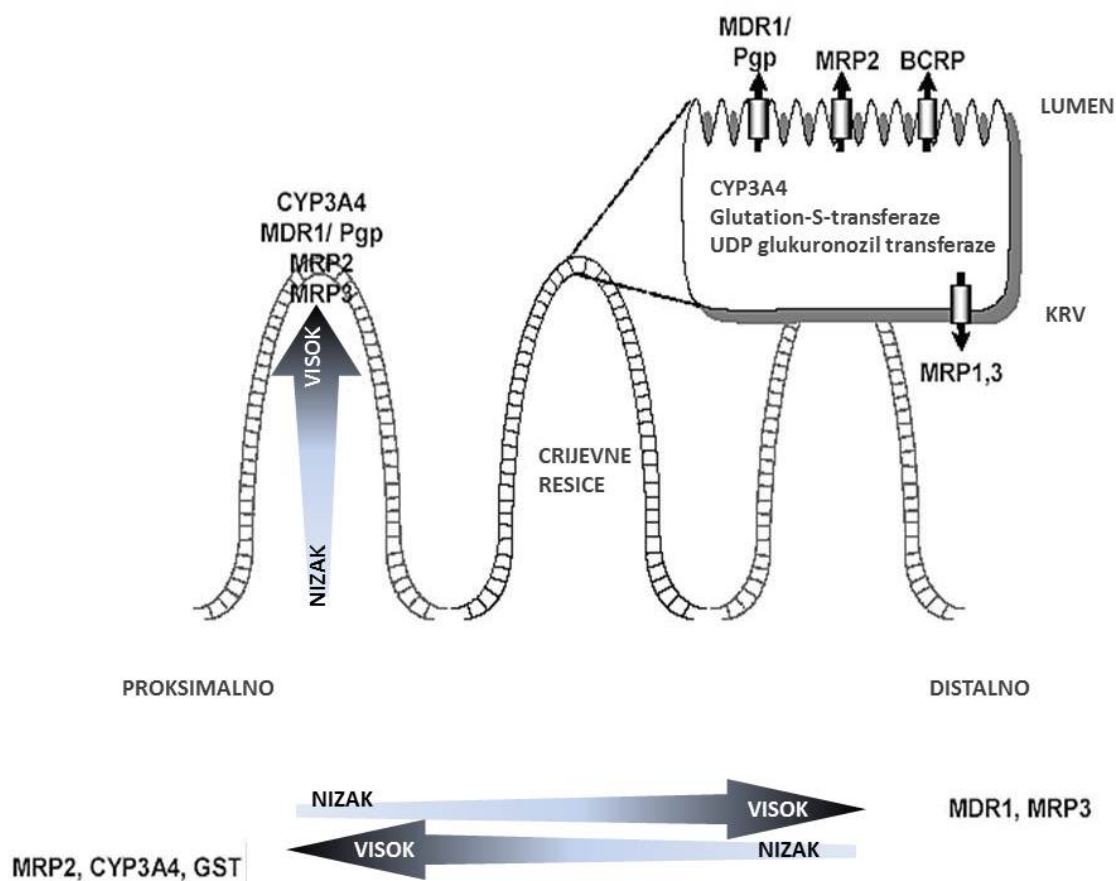
2.7.3. MDR1

Protein stanične membrane uključen u izbacivanje stranih tvari iz stanica, MDR1 (P-gp, P-glikoprotein), prvi puta je pronađen u jajnim stanicama kineskog hrčka (engl. *Chinese hamster ovary cells*, CHO) koje su ispoljavale rezistenciju na lijekove. Član je porodice ABC transportera koji za svoje funkcioniranje upotrebljavaju energiju dobivenu iz hidrolize ATP-a. P-gp je 170 kDa transmembranski glikoprotein sa širokim spektrom supstrata [164]. Postoje dva modela transporta supstrata. Prvi, model „vakuum čistača“ pretpostavlja da lijekovi stupaju u interakciju s P-glikoproteinom unutar hidrofobnog dijela membranskog dvosloja, ulaze u transporter između dvije polovice te bivaju transportirani u izvanstanični prostor. U modelu „flipaze“ smatra se da P-gp može prebaciti supstrate iz unutrašnjeg u vanjski sloj dvosloja [165]. P-gp je široko rasprostranjen i eksprimiran u različitim tkivima i stanicama poput hepatocita, stanicama proksimalnih tubula bubrega, krvno-moždanoj barijeri, placenti, jajnicima, testisima, te crijevnom epitelu gdje je odgovoran za izbacivanje ksenobiotika (lijekovi i toksini) iz stanica čime utječe na njihovu biodostupnost [6, 7].



Slika 5. Predloženi mehanizam izbacivanja supstrata putem ABC transportera. Supstrat i ATP se vežu za transporter. Nakon hidrolize ATP-a dolazi do otpuštanja fosfata i izbacivanja supstrata u izvanstanični prostor. Preuzeto i prilagođeno prema Chai i sur. [166].

U tkivu crijeva Pgp/MDR1 je eksprimiran apikalno na enterocitima i izbacuje supstrate u crijevni lumen (**Slika 6.**). Smještaj, ekspresija i funkcija P-gp-a ukazuju na njegovu važnu ulogu u izbacivanju ksenobiotika i toksina s ciljem zaštite organizma. Njegova povišena ekspresija u brojim tumorskim stanicama ukazuje na rezistentni fenotip; smanjenu unutarstaničnu akumulaciju lijeka i pojačano izbacivanje lijeka [167–170]. Gen za MDR1 je kloniran u hrčku [171], mišu [172], i ljudima [173] te je prvi i ujedno najbolje opisan ABC transporter otkriven u sisavcima. Također, pronađeno je da ima homologne sljedove s bakterijskim ABC transporterima. U miševa su pronađena dva gena, *Abcb1a* i *Abcb1b* (*Mdr1a* i *Mdr1b*) koji dijele 80% homologije s ljudskim P-gp-om i čini se da imaju slične uloge s ljudskim transporterom. Transkripcija P-gp-a je konstitutivna i postoje brojni čimbenici koji je mogu inducirati, a važne regulatore njihove ekspresije predstavljaju transkripcijski čimbenici NF-Y, Sp1 i MEF1. Transkripciju mogu inducirati i mutacije u p53, u uvjetima maligne transformacije može doći do povećanja njegove ekspresije dok deacetilacija histona, DNA metilacija kao i sam p53 mogu inhibirati njegovu transkripciju [174].



Slika 6. Ekspresija ABC transportera u tankom crijevu. Ekspresija je pretežito u enterocitima i varira od proksimalnog prema distalnom. Apikalna ekspresija je zaslužna za povećano izbacivanje i smanjenu apsorpciju, dok bazolateralana ekspresija povećava apsorpciju. Preuzeto i prilagođeno prema Chan i sur.[2]

Uloga P-gp-a u patogenezi UBC-a još uvijek je predmetom rasprave. Brojni lijekovi koji se koriste u liječenju UBC-a su ujedno i supstrati P-gp-a, poput ciklosporina [175], steroida i 5-aminosalicilata [176–179]. Izgleda da osim uloge u rezistenciji na lijekove, P-gp sudjeluje u patogenezi UBC-a pogotovo što je lokacija MDR1 gena na kromosomu 7 koji se smatra jednim od lokusa za podložnost razvoja UBC-a. Pokazano je da genetski modificirani *mdr1a*^{-/-} miševi razvijaju spontanu crijevnu upalu potaknutu normalnom bakterijskom florom koja nalikuje ulceroznom kolitisu ljudi [180]. Također, istraživanje genetskih polimorfizama P-gp-a ukazuju na njegovu uključenost u patogenezu UBC-a [181–185].

2.7.4. MRP1

Protein povezan s višestrukom rezistencijom na lijekove, MRP1, prvi puta je otkriven u staničnoj liniji karcinoma pluća malih stanica (engl. *small cell lung cancer*) H69AR, koje su razvile rezistenciju neovisnu o MDR1 [186]. MRP1 pripada porodici ABC, podskupini C koja ukupno broji 12 članova; *ABCC1-ABCC12*. MRP1 je jako glikozilirani 190 kDa ABC transporter i njegov aminokiselinski slijed je konzerviran između ljudi i glodavaca s 88% homologije. Jako je izražen u srcu, koži, plućima, endotelnim stanicama moždanih kapilara i tankom crijevu [187, 188]. Odgovoran je za izbacivanje konjugata glutationa (GSH), sulfata ili glukuronske kiseline [189, 190]. Također može transportirati i hidrofobne tvari, ali uz prisustvo GSH. Neke supstrate MRP1 dijeli s MDR1, poput vinka alkaloida, antraciklina, kolhicina i nitoksantrona [191].

Transkripcijska regulacija MRP1 uključuje mnoge transkripcijske čimbenike poput Sp1, elementa antioksidativnog odgovora (engl. *antioxidant response element*, ARE), motiva smještenog u promotoru *Mrp1* gena ukazujući na njegovu ulogu u oksidativnom stresu. Poput P-gp-a, i *Mrp1* ima zaštitnu ulogu izbacujući supstrate, poput endo i ksenobiotika iz stanice te na taj način smanjiti staničnu toksičnost. Istraživanja na miševima bez aktivnosti *Mrp1* pokazuju da ti miševi imaju normalan fenotip sve dok nisu izloženi upalnom stresu [192]. Budući je uključen u regulaciju razine glutationa, vjerojatno igra važnu ulogu u ozljedama tkiva induciranim oksidativnim stresom.

2.7.5. BCRP

BCRP je otkriven 1998. u staničnoj liniji tumora dojke koja je bila visoko rezistentna na doksorubicin, a nije izražavala ni MDR1 ni MRP1 ovisnu rezistenciju [193]. Za razliku od MDR1 i MRP1, BCRP je polutransporter kojemu je za funkcioniranje potrebna homodimerizacija [194]. Primarno je izražen na apikalnoj membrani tankog crijeva, jetri, mliječnim žlijezdama, testisima, krvno-moždanoj barijeri i placenti [195]. Odgovoran je za izbacivanje nekoliko kemoterapeutika, poput mitoksantrona, doksorubicina, imatiniba i metotreksata, kao i nekih karcinogena iz hrane i vitamina poput riboflavina i folne kiseline [196]. Njegova transkripcijska regulacija slična je onoj MDR1 i MRP1 [197], pa ne iznenađuje preklapanje u funkciji. No ipak, smatra se da je njegova glavna zaštitna uloga sprječavanje nakupljanja lijekova, endo i ksenobiotika s obzirom na mjesta njegove ekspresije, poput crijeva, krvno-moždane barijere i placent. S druge strane, može igrati negativnu ulogu u mliječnim žlijezdama gdje, unatoč tome što izbacuje vitamine poput

riboflavina, mnogi njegovi drugi supstrati, poput kemoterapeutika i karcinogena mogu se također koncentrirati u mlijeku [198].

3. OBRAZLOŽENJE TEME I HIPOTEZA

Cilj našeg rada je istražiti odnos ekspresija triju membranskih transportera uključenih u zaštitu crijevne barijere (*MDR1*, *MRP1* i *BCRP*), kao i ekspresiju proupalnih citokina, na različitim lokacijama duž probavnog sustava između djece i odraslih oboljelih od UBC-a (CB i UK) i odgovarajućih zdravih ispitanika te utvrditi postoji li povezanost između ekspresija transportera i proupalnih citokina kao i opsega bolesti.

Hipoteza

Upala, odnosno izlučeni citokini i regulatori citokinske signalizacije utječu na snižavanje/povišenje ekspresije *MDR1*, *MRP1* i *BCRP*-a u upalnim bolestima crijeva. Izazvana promjena u ekspresiji transportera razlikuje se ovisno o stadiju bolesti i može utjecati na biodostupnost lijekova koji se koriste u liječenju bolesti, kao i dodatno doprinijeti pogoršanju upale propuštajući potencijalno štetne tvari kroz crijevnu stijenku.

Specifični ciljevi su:

1. odrediti profil ekspresije *MDR1*, *MRP1* i *BCRP*-a na šest lokacija duž probavnog sustava (terminalni ileum te uzlazno, poprečno silazno i zavijeno debelo crijevo i ravno crijevo) kod odraslih, kao i na lokacijama terminalni ileum i silazno crijevo kod djece oboljele od CB-a i UK-a te zdravih ispitanika
2. utvrditi razlike u ekspresiji *MDR1*, *MRP1* i *BCRP*-a između triju grupa (novodijagnosticirana bolest bez terapije, bolesnici pod terapijom i remisija) oboljelih od UBC-a i odgovarajućih zdravih ispitanika
3. odrediti ekspresiju citokina i regulatora citokinske signalizacije kod odraslih i pedijatrijskih ispitanika oboljelih od CB-a i UK-a u trima različitim fazama bolesti (novodijagnosticirana bolest bez terapije, bolesnici pod terapijom i remisija), kao i odgovarajućih zdravih ispitanika
4. utvrditi razlike u ekspresiji citokina i regulatora citokinske signalizacije između oboljelih i zdravih ispitanika
5. utvrditi postoji li poveznica između ekspresija citokina i regulatora citokinske signalizacije s ekspresijom transportera od interesa, kao i s opsegom bolesti

4. MATERIJALI I METODE

4.1. Ispitanici i uzorci

U istraživanje su bile uključene četiri skupine ispitanika. Prvu skupinu ispitanika činile su odrasle osobe oboljele od UBC-a. Bolesnici su liječeni u Kliničkoj bolnici “Sestre Milosrdnice” i Kliničkoj bolnici Dubrava. Uzorci bioptata crijevne sluznice uzeti su za vrijeme rutinske kolonoskopije sa šest lokacija duž probavnog sustava: terminalni ileum, uzlazno crijevo, poprečno crijevo, silazno crijevo, zavijeno crijevo te ravno crijevo. Drugu skupinu ispitanika, odrasle zdrave kontrole, činile su osobe koje su na pregled dolazile zbog anemije, rektalnog krvarenja ili funkcionalnih poremećaja poput iritabilnog sindroma crijeva. Treću skupinu činila su djeca oboljela od upalnih bolesti crijeva koja su se liječila u Klinici za dječje bolesti Zagreb. Uzorci bioptata uzimani su također za vrijeme rutinske ileokolonoskopije s lokacija terminalni ileum i silazno crijevo. Uzimanje uzoraka s ostalih lokacija uzetih kao kod odraslih ispitanika ovdje nije bilo moguće budući da je riječ o djeci. Zbog toga su, u dogovoru s nadležnim liječnicima, odabrane upravo ove dvije lokacije koje obuhvaćaju mjesta najčešće zahvaćena kod svakog oblika upalnih bolesti crijeva. Četvrtu skupinu ispitanika, dječje zdrave kontrole, činila su djeca koja su na preglede dolazila zbog anemije, rektalnog krvarenja ili diareje.

Kod svih odraslih bolesnika dijagnoza je postavljena na temelju kliničkih karakteristika, kao i rezultata endoskopskih, patohistoloških i laboratorijskih ispitivanja. Dijagnoza upalnih bolesti crijeva kod djece je postavljena na temelju modificiranih Porto dijagnostičkih kriterija [199]. Aktivnost bolesti u djece ocijenjena je pomoću Indeksa aktivnost pedijatrijske Crohnove bolesti (engl. *Pediatric Crohn's Disease Activity Indeks*, PCDAI) [200] za CB i Indeksa aktivnost pedijatrijskog ulcerativnog kolitisa (engl. *Pediatric Ulcerative Colitis Activity Index*, PUCAI) [201] za UK. Aktivna bolest je definirana s PCDAI >10 ili PUCAI >10 i prisutnošću mukoznih lezija prilikom ileokolonoskopije. Kod svih ispitanika kontrolne grupe (odrasli i djeca) ileokolonoskopija je bila potpuno normalana (prema makroskopskim i patohistološkim pokazateljima).

Obje skupine oboljelih su podijeljene u tri grupe ovisno o statusu bolesti:

- N (neliječeni) grupa koju čine novodijagnosticirani bolesnici koji nisu primili terapiju za liječenje upalnih bolesti crijeva

- A (liječeni) grupa koju čine bolesnici s aktivnom upalom i koji su pod odgovarajućom terapijom
- R grupa koju čine bolesnici u remisiji

Dodatno, četiri odrasla bolesnika s UK-om praćena su tijekom terapije od postavljanja dijagnoze do remisije bolesti. Tri ispitanika praćena su u dvjema točkama budući da su odmah nakon postavljanja dijagnoze i primitka terapije ušli u remisiju bolesti. Međutim, jedan ispitanik je praćen u četirima točkama, odnosno, nakon postavljanja dijagnoze primio je terapiju, no nakon tri mjeseca bolest je još uvijek bila u aktivnoj fazi. Šest mjeseci nakon postavljanja dijagnoze, ispitanik je ušao u remisiju, međutim, šest mjeseci nakon remisije je relapsirao.

Istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo Kliničkih bolnica „Sestre Milosrdnice“ i Dubrava, kao i Klinike za dječje bolesti Zagreb. Svaki ispitanik potpisao je suglasnost za sudjelovanje u istraživanju nakon usmenog objašnjenja dizajna istraživanja i predočnja iscrpne obavijesti o istraživanju prilagođene općoj populaciji radi boljeg razumijevanja. U slučaju uzimanja uzoraka od djece, suglasnost su potpisali roditelji ili zakonski ovlašteni staratelji.

4.2. Stabilizacija tkiva

Bioptat tkiva sluznice crijeva uzet prilikom kolonoskopije odmah je stabiliziran s ciljem očuvanja kvalitete RNA budući da je RNA iznimno osjetljiva i podložna razgradnji RNazama koje se nalaze posvuda.

Tkivo je odmah po uzimanju uronjeno u otopinu RNAlater i ostavljeno preko noći u hladnjaku pri +2 do +8°C. Tako stabilizirano tkivo može stajati tjedan dana na sobnoj temperaturi, mjesec dana u hladnjaku na +4°C ili nekoliko godina pohranjeno na -80°C. U svrhu dugoročne pohrane na -80°C potrebno je ukloniti otopinu prije same pohrane.

4.3. Homogenizacija tkiva

Tkivo stabilizirano otopinom RNAlater izvađeno je pincetom i izmjerena je masa tkiva. Prema protokolu proizvođača kompleta korištenog za izolaciju, procesirati se može maksimalno 15-20 mg RNAlater stabiliziranog tkiva. Prije izolacije ukupne RNA potrebno je homogenizirati tkivo kako bi se razbile stanice i omogućio izlazak RNA. U tu svrhu korišten je homogenizator (IKA Ultra-turax t 25, Labortechnik, Staufen, Njemačka) i pufer RLTKoji

je dio kompleta za izolaciju RNA. Pufer RLT sadrži gvanidin-isotiocijanat koji je inaktivator RNaza. U pločice s jažicama dodano je po 600 μL pufera RLT i 6 μL β -merkaptetanola te je tkivo uronjeno i homogenizirano na najnižoj brzini između 15-20 sek. Nakon homogenizacije smjesa je pažljivo resuspendirana i prenesena u čistu Eppendorf epruvetu. Homogenizat je centrifugiran 3 min na maksimalnoj brzini centrifuge ($> 10,000$ rpm). Nakon centrifugiranja, pipetiranjem je pažljivo pokupljen nadtalog pazeći da se ne pokupi talog koji je izrazito viskozan te je prenesen u novu epruvetu.

4.4. Izolacija ukupne RNA

Izolacija ukupne stanične RNA provedena je pomoću kompleta RNeasy Mini kit (Qiagen, Hilden, Njemačka) prema protokolu proizvođača. U dobiveni nadtalog iz homogenizacije dodan je 1 volumni dio 70% etanola (naspram volumena nadtaloga) i smjesa je promiješana. Na kolonu RNeasy spin smještenu u 2 ml kolekcijskoj epruveti preneseno je do 700 μL uzorka koji je centrifugiran 15 sek. na > 8000 g. Nakon centrifugiranja otopina koja je prošla kroz kolonu je uklonjena, a kolona je vraćena u kolekcijsku epruvetu. Ukoliko je volumen uzorka bio veći od 700 μL , prethodni postupak je ponovljen. Zatim je u kolonu dodano 700 μL pufera RW1 te je uzorak centrifugiran 15 sek. na > 8000 g. Otopina koja je prošla kroz kolonu je uklonjena. Nakon toga je u dva navrata dodano po 500 μL pufera RPE, samo što je prvi puta uzorak centrifugiran 15 sek. na > 8000 g, a drugi puta 2 min. na istoj brzini. Duže centrifugiranje je neophodno za isušivanje membrane kolone što osigurava da se etanol ne prenese za vrijeme elucije RNA. RNeasy kolona je zatim pažljivo uklonjena iz kolekcijske epruvete i stavljena u novu 2 mL kolekcijsku epruvetu i centrifugirana na maksimalnoj brzini centrifuge. Ovaj korak se radi s ciljem eliminacije mogućeg prijenosa pufera RPE. Potom je RNeasy kolona izvađena i stavljena u 1,5 mL kolekcijsku epruvetu te je dodano 30-50 μL vode bez prisutnosti RNaze izravno na membranu kolone. Nakon centrifugiranja 1 min. na > 8000 g. epruveta s eluatom RNA je pohranjena na -80°C . Prije toga je mala količina uzorka odvojena za određivanje čistoće i količina izolirane RNA spektrofotometrijski (Bio Photometer, eppendorf) mjerenjem apsorbancija na 260 i 280 nm.

4.5. Reverzna transkripcija RNA

Reverzna transkripcija (RT) je metoda pomoću koje RNA od interesa prepisujemo u komplementarnu DNA (cDNA, *engl. complementary DNA*) pomoću enzima reverzne transkriptaze. Dobivena cDNA služi kao predložak za eksponencijalnu amplifikaciju pomoću standardne lančane reakcije polimerazom (*engl. polymerase chain reaction, PCR*). Do 2 μg

ukupne izdvojene RNA podvrgnuto je procesu reverzne transkripcije uporabom kompleta High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit i RNA-znog inhibitora (Applied Biosystems) prateći protokol proizvođača. Ukratko, sastojci kompleta ostavljeni su na ledu s ciljem polaganog otapanja. Odredi se željeni broj reakcija i prema uputama proizvođača izračuna potrebna količina svakoj pojedinog reagensa. U svaki uzorak RNA (u ukupnom volumenu od 10 µL) dodano je 10 µL 2xRT smjese dobivene miješanjem potrebnih reagensija (2,0 µL 10x pufera RT; 0,8 µL 25x dNTP; 2,0 µL 10x nasumičnih RT početnica; 1µL enzima reverzne transkriptaze; 1µL inhibitora RNaza; 3,2µL vode bez prisutnosti RNaza). Ukupni volumen reakcije iznosio je 20 µL. Epruvete s uzorcima stavljene su u PCR uređaj programiran na: 25 °C/10min, 37 °C/120min, 85 °C/5 min, 4 °C/∞, prema uputama proizvođača. Dobivena cDNA pospremljena je na – 20 °C do daljnje obrade.

4.6. Kvantitativna lančana reakcija polimeraze

Kvantitativna lančana reakcija polimerazom (engl. *Quantitative Polymerase chain reaction*, qPCR) je laboratorijska tehnika koje se bazira na lančanoj reakciji polimerazom u kojoj se istodobno odvija umnožavanje (amplifikacija), detekcija i kvantifikacija ciljnog dijela DNA molekule. cDNA od interesa umnožena je i analizirana opisanom metodom pomoću uređaja ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems) pod sljedećim cikličkim uvjetima: 95 °C/10min, 40 ciklusa: 95 °C/15sek., 60 °C/1 min., prema uputama proizvođača. Analizirana je ekspresija ABC transportera (*MDR1*, *MRP1* i *BCRP*), proupalnih citokina (IL-2, IL-6, IL-1β, IL-17A, IFN-γ), te supresora citokinske signalizacije (SOCS1 i SOCS3) pomoću komercijalno dostupnih setova kemikalija TaqMan Gene Expression Assay (Applied Biosystems) i TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems) prema uputama proizvođača. Kod odraslih ispitanika i njihovih kontrola, ekspresija ABC transportera određena je na svih šest lokacija, dok je ekspresija citokina i supresora citokinske signalizacije određena samo na lokacijama terminalni ileum i zavijeno crijevo, dok su kod djece obrađene obje lokacije za sve ispitivane molekule. Popis korištenih kompleta početnica i sonde TaqMan nalazi se u **Tablici 1**. Kompleti TaqMan sastoje se od para specifičnih početnica i probe koja na 5' kraju ima vezanu fluorescentnu boju, a na 3'-kraju hvatač fluorescencije (NFQ, engl. *nonfluorescent quencher*). Dok god se hvatač fluorescencije i fluorescentna boja nalaze na probi, signal izostaje. No, kako dolazi do umnažanja dolazi i do cijepanja probe, oslobađanja NFQ od fluorescentne boje te porasta fluorescencije u stvarnom vremenu. Relativna količina RNA u uzorku izražena je u odnosu

na količinu RNA za GAPDH (engl. *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase*) koji je korišten kao „endogena“ kontrola.

Tablica 1. Kompleti početnica i sonde TaqMan korištene za kvantitativnu lančanu reakciju polimerazom

Gen	TaqMan assay
<i>MDR1</i>	Hs00184491_m1
<i>MRP1</i>	Hs00219905_m1
<i>BCRP</i>	Hs00184797_m1
<i>IFN-γ</i>	Hs00989291_m1
<i>IL-2</i>	Hs01555413_m1
<i>IL-6</i>	Hs00985641_m1
<i>IL-1β</i>	Hs00174383_m1
<i>IL-17</i>	Hs00174114_m1
<i>SOCS1</i>	Hs00705164_s1
<i>SOCS3</i>	Hs02330328_s1

4.7. Statistička obrada podataka

Svako određivanje ekspresije gena rađeno je u triplikatu. Značajnu razliku pri testiranju predstavljala je vrijednost $P < 0,05$.

Podatci su analizirani pomoću komparativne Ct metode (delta delta Ct metoda) i dobiveni rezultati su prezentirani kao odnos relativne razine transkripata kod bolesnika s UBC-om i razine transkripata zdravih osoba. Nakon određivanja distribuiranosti podataka pomoću Shapiro-Wilk W testa, i naknadne logaritamske transformacije ne-normalno distribuiranih varijabli, ekspresija ispitivanih molekula u svakom isječku crijeva ispitanika s UBC-om

uspoređena je s onima dobivenim za kontrolnu skupinu ispitanika multivarijabilnom regresijskom analizom. Prilikom toga, godine, spol i terapija za liječenje UBC-a uzete su kao potencijalni čimbenici koji bi mogli utjecati na rezultate. Za analizu korelacija između ekspresije mRNA transportera i ispitivanih citokina, kao i za korelaciju između ekspresije transportera/citokina i aktivnosti bolesti izračunali smo Spearman korelacijski koeficijent. Sve statističke analize su napravljene pomoću STATA 13.0 (StataCorp. 2013. *Stata Statistical Software: Release 13*. College Station, TX: StataCorp LP) statističkog programa.

5. REZULTATI

5.1. Karakteristike ispitanika

U ovom radu istražena je ekspresija ABC transportera (*MDR1*, *MRP1*, *BCRP*), proupalnih citokina ($\text{IFN-}\gamma$, IL-2, IL-6, IL-1 β , IL-17A) i supresora signalizacije citokina (SOCS1 i SOCS3) kod dvije grupe bolesnika. Osnovne karakteristike ispitanika prikazane su u **Tablici 2.**, za odrasle, te **Tablici 3.**, za djecu. Skupinu odraslih bolesnika s UBC-om činilo je 25-ero oboljelih od CB-a prosječne dobi $43.46 \pm 13,7$ godina, i 27-ero oboljelih od UK-a prosječne dobi $53,82 \pm 15,3$ godina. Skupinu bolesne djece činilo je 26-ero oboljelih od CB-a prosječne dobi $14,1 \pm 3,0$ godina i 21 oboljelih od UK-a prosječne dobi $13,7 \pm 4,1$. Kontrolnu skupinu za odrasle činilo je 10-ero ispitanika prosječne dobi $57,86 \pm 17,4$ godina, a za djecu 15-ero ispitanika prosječne dobi $13,1 \pm 4,1$. Između skupina odraslih oboljelih i kontrola postojala je statistička razlika po dobi ($P=0,024$ za CB; $P=0,038$ za UK), dok između skupina djece nije bilo razlika.

Od ukupno 17 odraslih bolesnika s aktivnom upalom, 76,5% je imalo umjerene simptome, dok je njih 23,5% imalo teške simptome bolesti. Kod djece, od ukupno 19 bolesnika s aktivnom upalom, 42,1% je imalo blage simptome, 36,8% umjerene, te 21,1% teške simptome bolesti. Patološka jačina bolesti u slučaju CB-a određena je pomoću CDAI indeksa aktivnosti bolesti, a u slučaju UK-a pomoću indeksa jačine bolesti Truelove-Witts.

Tablica 2. Karakteristike odraslih ispitanika

	Kontrole	CB N	CB A	CB R	UK N	UK A	UK R
Br. ispitanika	10	8	9	8	9	10	8
Godine (srednja vrijednost)	57,86 ± 17,4	41,38 ± 11,46	40,22 ± 13,78	46,88 ± 16,87	48,22 ± 20,40	50,7 ± 14,81	50,43 ± 12,99
Spol							
Ž	1	4	3	1	4	4	2
M	9	4	6	7	5	6	6
Proširenost bolesti							
CB							
Ileum	-	8	9	8	-	-	-
Ileokolon	-	-	-	-	-	-	-
Kolon	-	-	-	-	-	-	-
UK							
Lijevostrani	-	-	-	-	4	7	6
Pankolitis	-	-	-	-	5	3	2
Proktitis	-	-	-	-	-	-	-
Terapija							
5-aminosalicilati	-	-	7	6	-	10	5
Kortikosteroidi	-	-	5	3	-	4	2
Imunosupresivi	-	-	4	3	-	2	2
Ništa	10	8	-	-	9	-	-
Patološka jačina (Truelove-Witts)							
blaga	-	-	-	-	3	5	-
umjerena	-	-	-	-	3	4	-
jaka	-	-	-	-	3	1	-
Patološka jačina (CDAI)							
remisija	-	-	-	8	-	-	-
blaga	-	-	-	-	-	-	-
umjerena	-	7	7	-	-	-	-
jaka	-	1	2	-	-	-	-

CB, Crohnova bolest; UK, Ulcerozni kolitis; N, novodijagnosticirani (neliječeni); A, aktivna upala pod terapijom (liječeni); R, remisija; CDAI, Indeks aktivnosti Crohnove bolesti; Truelove-Witts, Indeks aktivnosti ulceroznog kolitisa

Tablica 3. Karakteristike pedijatrijskih ispitanika

	CB (n=26)			UK (n=21)			Kontrole (n=15)
	N	A	R	N	A	R	
Br. ispitanika	10	8	8	9	8	4	15
Godine (srednja vrijednost)		14,1±3			13,7±4,1		13,1±4,1
Spol							
M		14			11		8
Ž		12			10		7
Lokacija CB							
Terminali ileum	7	6	7	-	-	-	-
Ileokolon	3	2	1	-	-	-	-
Proširenost UK							
Lijevostrani	-	-	-	4	3	-	-
Ekstenzivni	-	-	-	3	4	4	-
Pankolitis	-	-	-	2	1	-	-
Terapija							
Ništa	10	-	-	9	-	-	15
Antibiotici	-	-	-	-	2	-	-
Sulfasalazin	-	-	1	-	2	3	-
Azatioprin	-	7	4	-	2	1	-
Methotrexate	-	1	-	-	-	-	-

Kortikosteroidi	-	2	1	-	4	1	-
Mesalamine	-	-	3	-	12	2	-
PCDAI							
< 10 remisija	-	-	8	-	-	-	-
10-27.5 blaga	8	6	-	-	-	-	-
30-37.5 umjerena	2	2	-	-	-	-	-
> 40 jaka	-	-	-	-	-	-	-
PUCAI							
< 10 remisija	-	-	-	-	-	4	-
10-34 blaga	-	-	-	8	7	-	-
35-64 umjerena	-	-	-	1	1	-	-
> 64 jaka	-	-	-	-	-	-	-

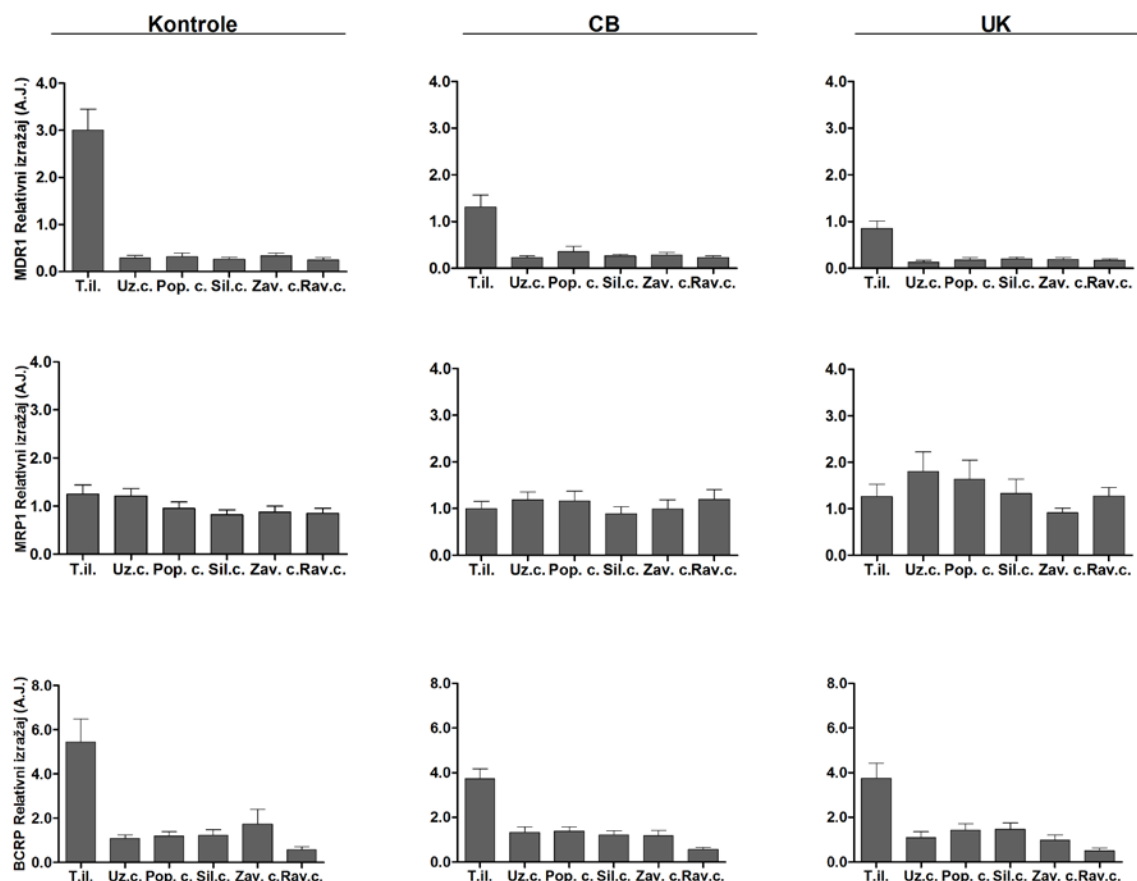
N, novodijagnosticirani (neliječeni); A, aktivna grupa pod terapijom (liječeni); R, remisija; PCDAI, Indeks aktivnosti pedijatrijske Crohnove bolesti; PUCAI, Indeks aktivnosti pedijatrijskog ulcerativnog kolitisa

5.2. Ekspresija ABC transportera

5.2.1. Ekspresija ABC transportera kod odraslih

U prvom nizu pokusa utvrdili smo profil ekspresije mRNA za gene *MDR1*, *MRP1* i *BCRP*-a na lokacijama terminalnog ileuma te od uzlaznog do ravnog crijeva zdravih ispitanika, da bi se vidjelo je li ekspresija analiziranih gena duž kolona konstantna te mogu li se utjecaji upale na različitim lokacijama kolona međusobno uspoređivati. Rezultati su prikazani kao relativna ekspresija u odnosu na ekspresiju *GAPDH*. Kao što je vidljivo na **Slici 7.**, ekspresija *MDR1* i *BCRP*-a prati sličan trend i kod kontrola i oboljelih od UBC-a, sa najvećom ekspresijom na terminalnom ileumu te nižom, konstantnom ekspresijom duž kolona.

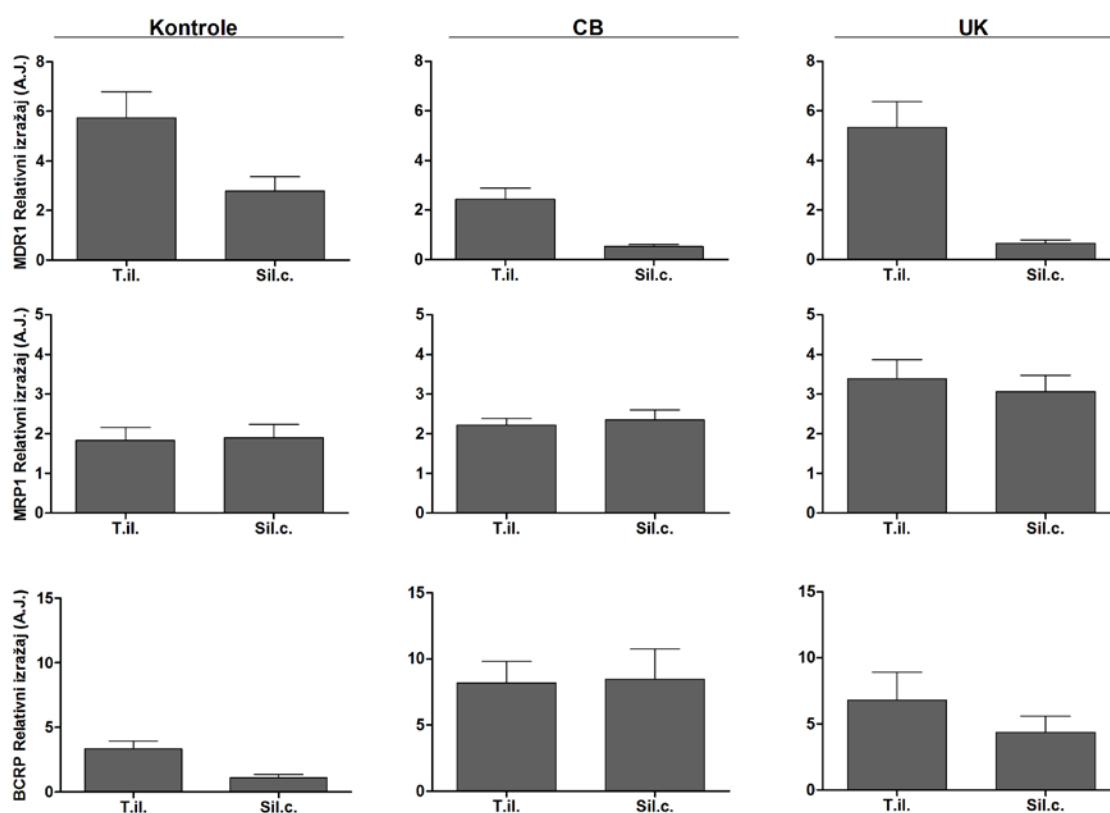
MDR1 ekspresija duž ispitanih lokacija svih triju grupa ne pokazuje značajne razlike te se može zaključiti da je njegova ekspresija od terminalnog ileuma do ravnog crijeva konstantna. Ovi rezultati pokazuju kako se učinci upale promatrani na različitim lokacijama duž kolona mogu međusobno uspoređivati.



Slika 7. Profil ekspresije ABC transportera kod odraslih. Analizirana je ekspresija mRNA ABC transportera *MDR1*, *MRP1* i *BCRP* na biopatima crijeвне stjenke zdravih kontrola (n=10), ispitanika oboljelih od CB-a (n=25) i UK-a (n=27). Ekspresija je analizirana kvantitativnom lančanom reakcijom polimerazom (RT-qPCR) inormaliziranaje u odnosu na gen *GAPDH*. Analiza ekspresije svakog gena provedena je u triplikatu. T.il.= terminalni ileum; Uz.c.= uzlazno crijevo; Pop.c.= poprečno crijevo; Sil.c.= silazno crijevo; Rav.c.= ravno crijevo; CB= Crohnova bolest; UK= ulcerozni kolitis; A.J.= Arbitrarne jedinice.

5.2.2. Ekspresija ABC transportera kod djece

Najprije smo odredili bazalnu ekspresiju triju ABC transportera u tkivu s dvije lokacije (terminalni ileum i silazno crijevo) uzetom tijekom ileokolonoskopije zdravih ispitanika te smo nakon toga odredili ekspresiju i kod oboljelih. Rezultati su prikazani kao relativna ekspresija u odnosu na ekspresiju *GAPDH*. Kao što je vidljivo na **Slici 8.**, i kod dječjih uzoraka primjetan je profil ekspresija za *MDR1*, *MRP1* i *BCRP*-a kao kod odraslih osoba. *MDR1* i *BCRP* pokazuju najvišu ekspresiju na terminalnom ileumu u odnosu na kolon, dok za *MRP1* nisu zamijećene razlike između ispitivanih lokacija.



Slika 8. Profil ekspresije ABC transportera kod djece. Analizirana je ekspresija ABC transportera *MDR1*, *MRP1* i *BCRP* na biopatima crijeвне stjenke kontrola (n=15), ispitanika oboljelih od CB-a (n=26) i UK-a (n=20). Ekspresija je analizirana kvantitativnom lančanom reakcijom polimerazom (RT-qPCR) i normalizirana u odnosu na gen *GAPDH*. Analiza ekspresije svakog gena provedena je u triplicatu. T.il.= terminalni ileum; Sil.c.= silazno crijevo; CB= Crohnova bolest; UK= ulcerozni kolitis; A.J.= Arbitrarne jedinice.

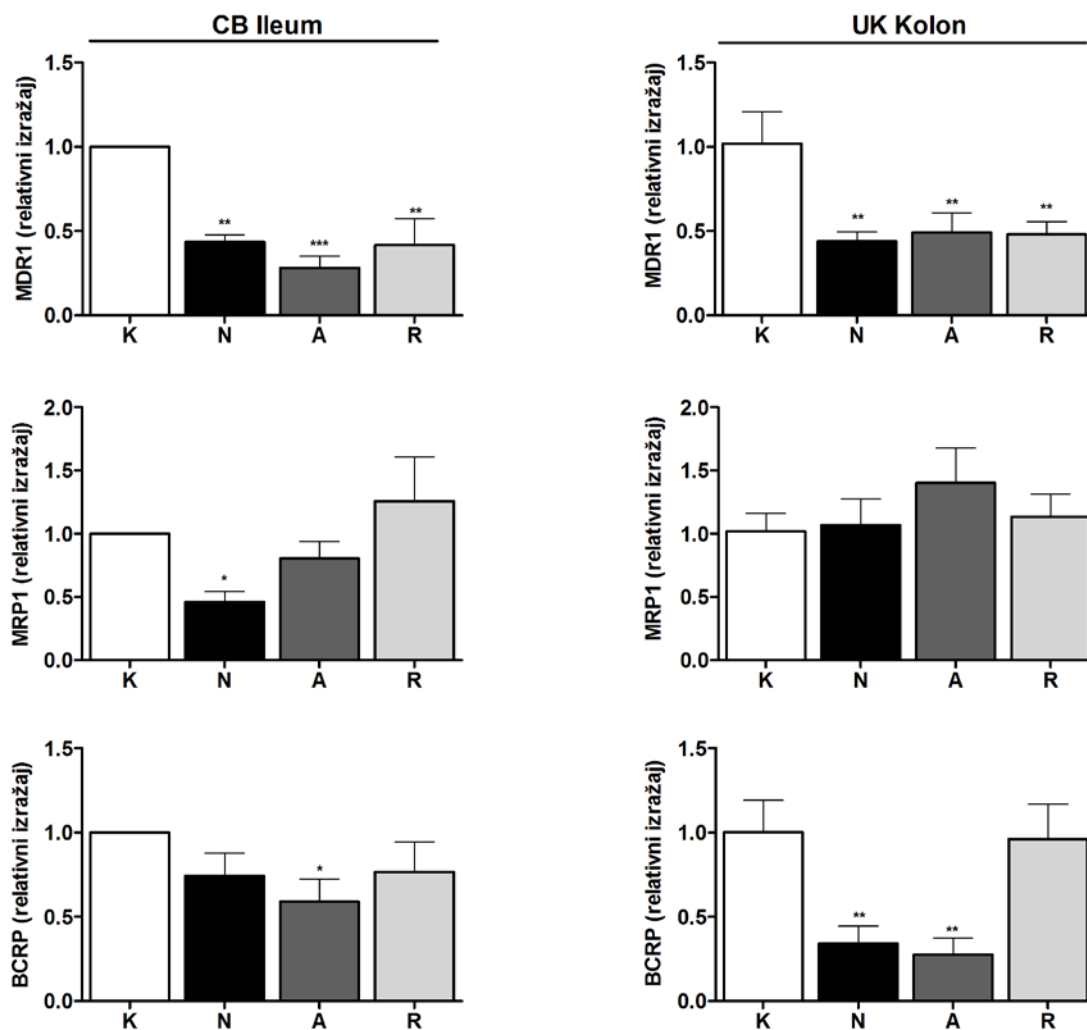
5.3. Odnos ekspresija ABC transportera između oboljelih od upalnih bolesti crijeva i zdravih ispitanika

5.3.1. Analiza ekspresije ABC transportera kod odraslih

Ekspresija *MDR1*, *MRP1* i *BCRP* na razini mRNA kod tri definirane grupe oboljelih od UBC-a uspoređena je s ekspresijom istih kod zdravih ispitanika pomoću metode $\Delta\Delta C_t$.

Na **Slici 9.** vidljivo je snižena ekspresija *MDR1* na upaljenom tkivu bolesnika s CB-om i UK-om u svim definiranim grupama u odnosu na zdrave ispitanike. Tako je kod CB-a ekspresija *MDR1* kod neliječenih bolesnika snižena za 56%, te za 72% u skupini pod terapijom u odnosu na zdrave ispitanike. U skupini bolesnika u remisiji je sniženje manje izraženo (58%), ali i dalje statistički značajno. Kod bolesnika s UK-om sniženje u ekspresiji *MDR1* među definiranim grupama je podjednako i iznosi prosječno 53% u odnosu na zdrave ispitanike. Duž kolona bolesnika s CB-om, koji nije zahvaćen bolešću, nisu pronađene razlike u jačini ekspresije *MDR1* između grupa. Kod bolesnika s UK-om nađene su razlike u jačini *MDR1* ekspresije i na nezahvaćenom terminalnom ileumu i to u sve tri definirane grupe (53% za N, odnosno 69% za A i R), te također na uzlaznom i poprečnom crijevu (**Slika 10.**).

Kao i kod *MDR1*, ekspresija *BCRP*-a je također snižena na terminalnom ileumu bolesnika s CB-om, a najveće razlike pronađene su u skupini liječenih gdje je ekspresija *BCRP*-a snižena za 41% u odnosu na zdrave ispitanike. Kod neliječenih bolesnika s CB-om ekspresija *BCRP*-a je statistički granično snižena ($P=0.070$) dok u remisiji nisu pronađene razlike. U bolesnika s UK-om pronađeni su drugačiji odnosi; ekspresija *BCRP*-a snižena je u obje grupe s aktivnom upalom (66% u N, odnosno 73% u A), dok je u remisiji s prolaskom upale ekspresija *BCRP*-a normalizirana na razinu ekspresije zdravih ispitanika. Što se tiče ekspresije *BCRP*-a duž kolona bolesnika s CB-om, kao i za *MDR1*, nisu pronađene razlike između definiranih grupa, dok je kod bolesnika s UK-om ekspresija *BCRP*-a snižena u grupi neliječenih bolesnika na nezahvaćenom terminalnom ileumu i duž preostalih lokacija kolona i to prosječno za 57% (**Slika 10.**).

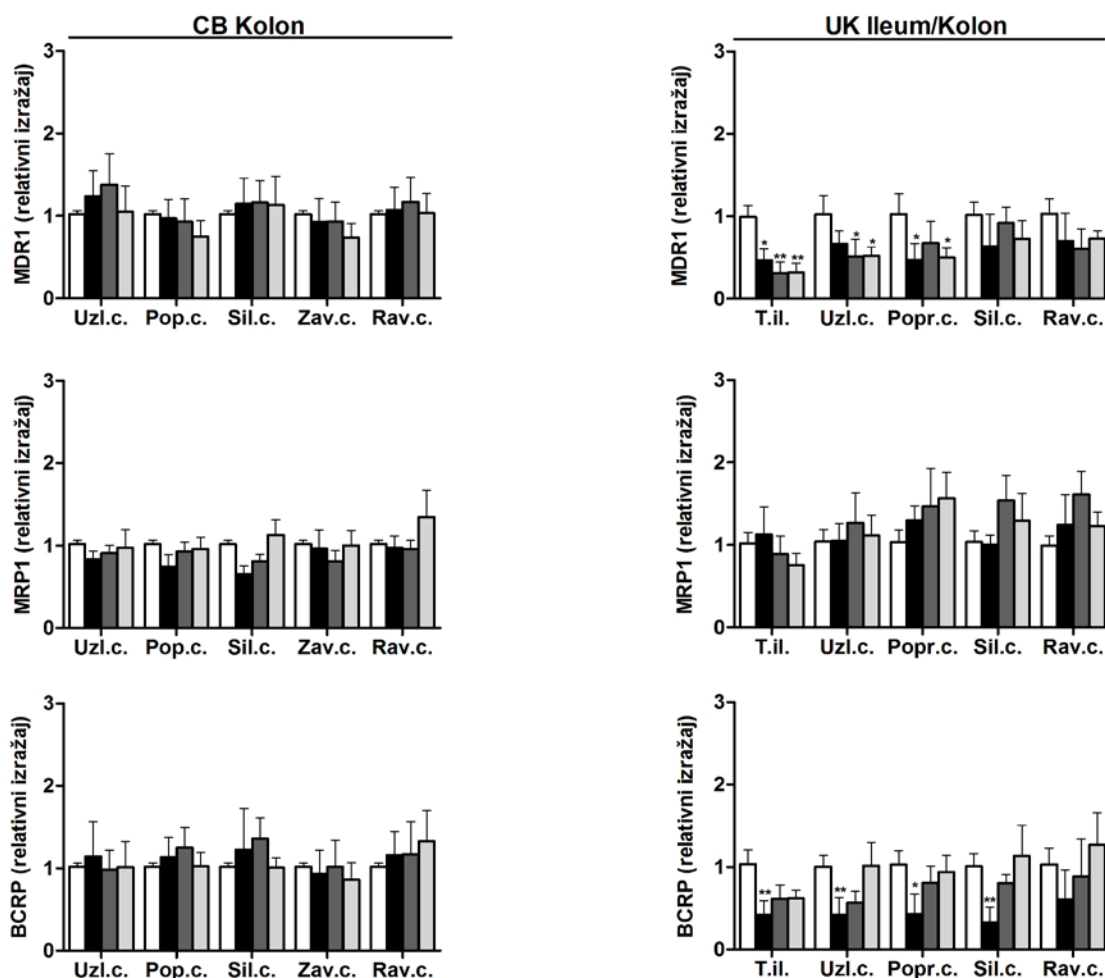


Slika 9. Ekspresija ABC transportera u upaljenom tkivu odraslih bolesnika s UBC-om.

Vrijednosti ekspresija normalizirane su prema genu za *GAPDH* i prikazane u odnosu na odgovarajuće lokacije kontrola. Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost \pm SEM. Biološki značajne razlike prikazane su s $*P < 0,05$ i $**P < 0,01$. Analiza ekspresije svakog gena provedena je u triplicatu. Crni stupići = N grupa (neliječeni); Tamno sivi stupići= A grupa (liječeni); Svijetlosivi stupići= R grupa (remisija); Bijeli stupići= kontrole; CB= Crohnova bolest; UK= ulcerozni kolitis.

Ekspresija *MRP1* na upaljenom ileumu bolesnika s CB-om snižena je za 54% u grupi neliječenih bolesnika, dok se ekspresija u A i R grupi ne razlikuje od zdravih ispitanika. Kod bolesnika s UK-om nisu pronađene razlike u *MRP1* ekspresiji među definiranim grupama.

Također, nisu pronađene razlike u njegovoj ekspresiji duž kolona bolesnika s CB-om, kao ni na terminalnom ileumu i duž preostalih lokacija kolona bolesnika s UK-om.



Slika 10. Ekspresija ABC transportera u ileumu i kolonu odraslih bolesnika s UBC-om.

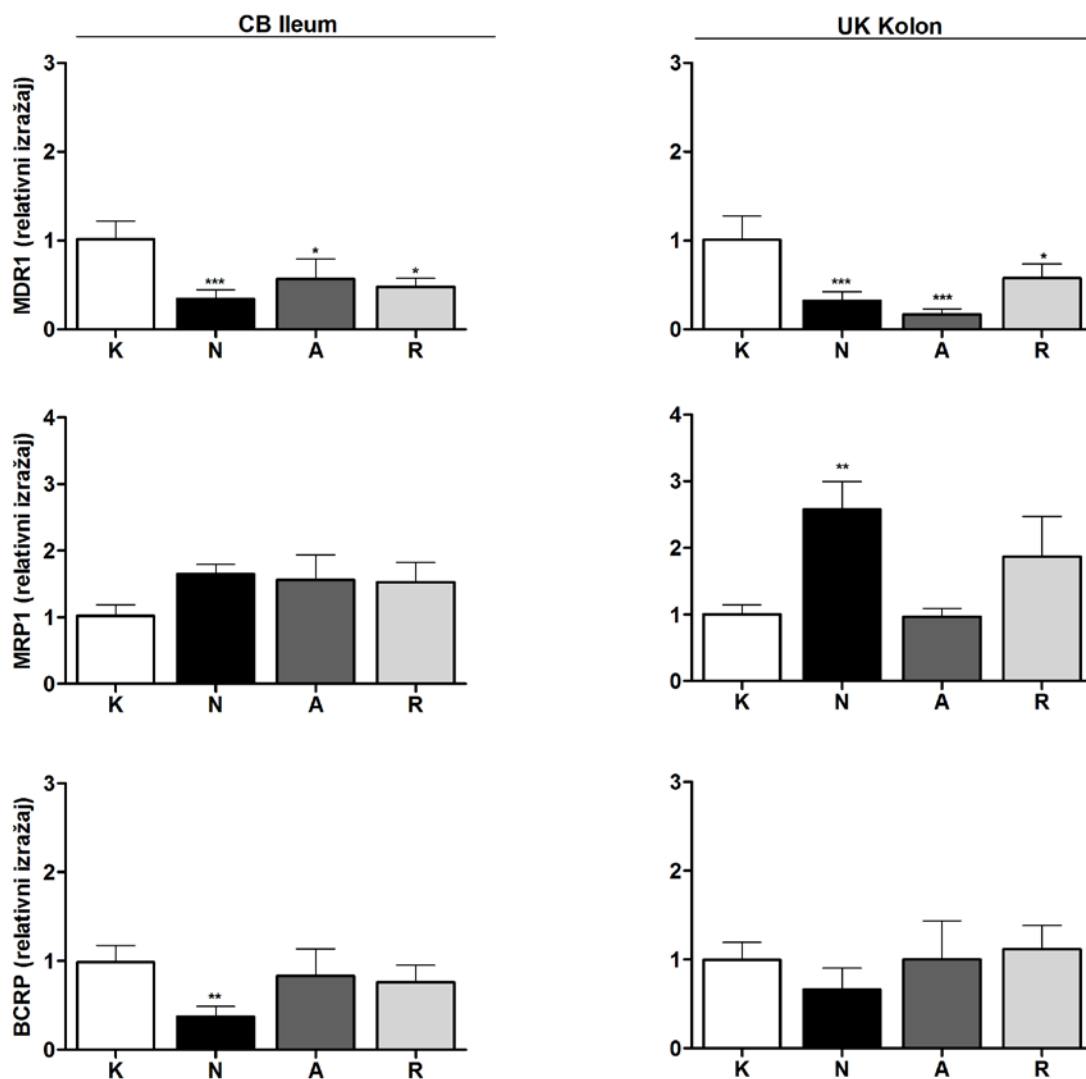
Vrijednosti ekspresija normalizirane su prema genu za *GAPDH* i prikazane u odnosu na odgovarajuće lokacije kontrole. Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost \pm SEM. Biološki značajne razlike prikazane su s $*P < 0,05$ i $**P < 0,01$ u odnosu na kontrole. Analiza ekspresije svakog gena provedena je u triplikatu. Crni stupići = N grupa (neliječeni); Tamno sivi stupići = A grupa (liječeni); Svjetlosivi stupići = R grupa (remisija); Bijeli stupići = kontrole; T.il.= terminalni ileum; Uz.c.= uzlazno crijevo; Pop.c.= poprečno crijevo; Sil.c.= silazno crijevo; Rav.c.= ravno crijevo; CB= Crohnova bolest; UK= ulcerozni kolitis.

5.3.2. Analiza ekspresije ABC transportera kod djece

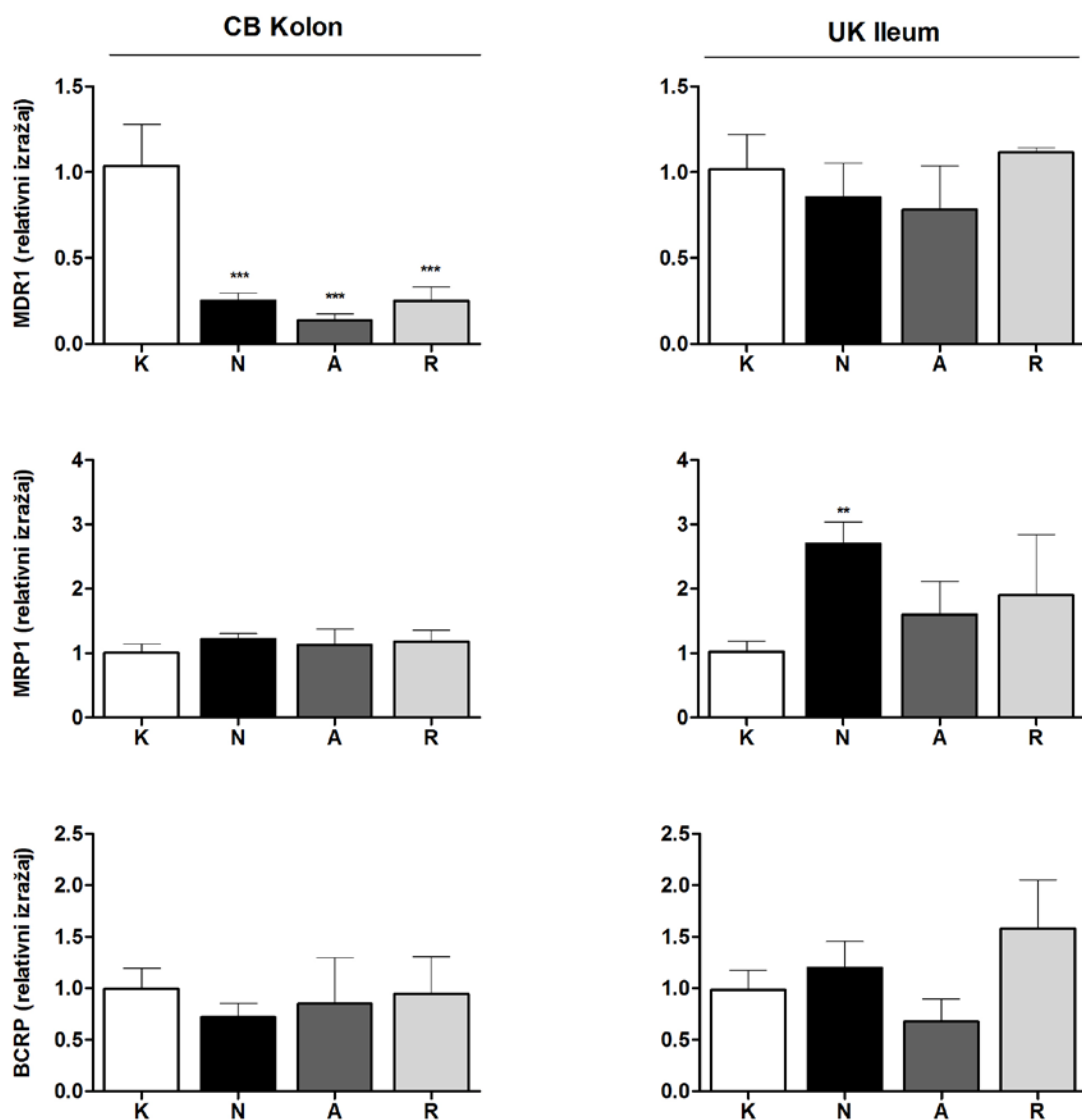
Ekspresiju gena za *MDR1*, *MRP1*, *BCRP*-a i *GAPDH* analizirali smo u 15 zdravih ispitanika (bazalna ekspresija transportera) i usporedili sa svima trima definiranim grupama ispitanika oboljelih od UBC-a.

Ekspresija *MDR1* na upaljenom tkivu bolesnika s CB-om i UK-om je značajno snižena u odnosu na zdrave ispitanike (**Slika 11.**). Kod bolesnika s CB-om, *MDR1* ekspresija je snižena za 66% u neliječenoj grupi, 43% u liječenoj grupi i za 52% u remisiji, dok je kod bolesnika s UK-om njegova ekspresija smanjena za 68%, odnosno 83% u nelijećenoj, odnosno liječenoj grupi u odnosu na zdrave ispitanike. Snižena ekspresija *MDR1* primijećena je i u remisiji, ali je to sniženje statistički granično značajno ($P=0,053$). Nismo primijetili razliku u ekspresiji *MRP1* između CB grupa, dok je na upaljenom kolonu bolesnika s UK-om njegova ekspresija $> 2,5x$ viša u nelijećenoj grupi (**Slika 11.**). Nadalje, ekspresija *BCRP*-a na upaljenom ileumu bolesnika s CB-om smanjena je za 63% u nelijećenoj grupi i 57% u liječenoj grupi (**Slika 11.**). Nismo pronašli razliku u ekspresiji *BCRP*-a u kolonu bolesnika s UK-om, iako je postojalo statistički granično značajno sniženje njegove ekspresije ($P=0,064$) u nelijećenoj grupi.

Zanimljive rezultate dobili smo na tkivu koje nije zahvaćeno s bolesti. Tako smo na nezahvaćenom kolonu bolesnika s CB-om također dobili značajno sniženje ekspresije *MDR1* od oko 78% u sve tri definirane grupe u odnosu na kontrole, dok se ekspresije *MRP1* i *BCRP*-a nisu razlikovale među grupama (**Slika 12.**). Na nezahvaćenom ileumu ispitanika s UK-om nismo pronašli razlike u ekspresiji *MDR1* niti *BCRP*-a, dok je *MRP1* pokazivao $2,5x$ višu ekspresiju u nelijećenoj grupi.



Slika 11. Ekspresija ABC transportera u upaljenom tkivu djece s UBC-om. Vrijednosti ekspresija normalizirane su prema genu za *GAPDH* i prikazane u odnosu na odgovarajuće lokacije kontrola. Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost \pm SEM. Biološki značajne razlike prikazane su s * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ i *** $P < 0,001$. Analiza ekspresije svakog gena provedena je u triplikatu. Crni stupići = N grupa (neliječeni); Tamno sivi stupići= A grupa (liječeni); Svijetlosivi stupići= R grupa (remisija); Bijeli stupići= kontrole. CB= Crohnova bolest; UK= ulcerozni kolitis.



Slika 12. Ekspresija ABC transportera u nezahvaćenom tkivu djece s UCB-om.

Vrijednosti ekspresija normalizirane su prema genu za *GAPDH* i prikazane u odnosu na odgovarajuće lokacije kontrola. Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost \pm SEM. Biološki značajne razlike prikazane su s ** $P < 0,01$ i *** $P < 0,001$. Analiza ekspresije svakog gena provedena je u triplicatu. Crni stupići = N grupa (neliječeni); Tamsno sivi stupići= A grupa (liječeni); Svijetlosivi stupići= R grupa (remisija); Bijeli stupići= kontrole; CB= Crohnova bolest; UK= ulcerozni kolitis.

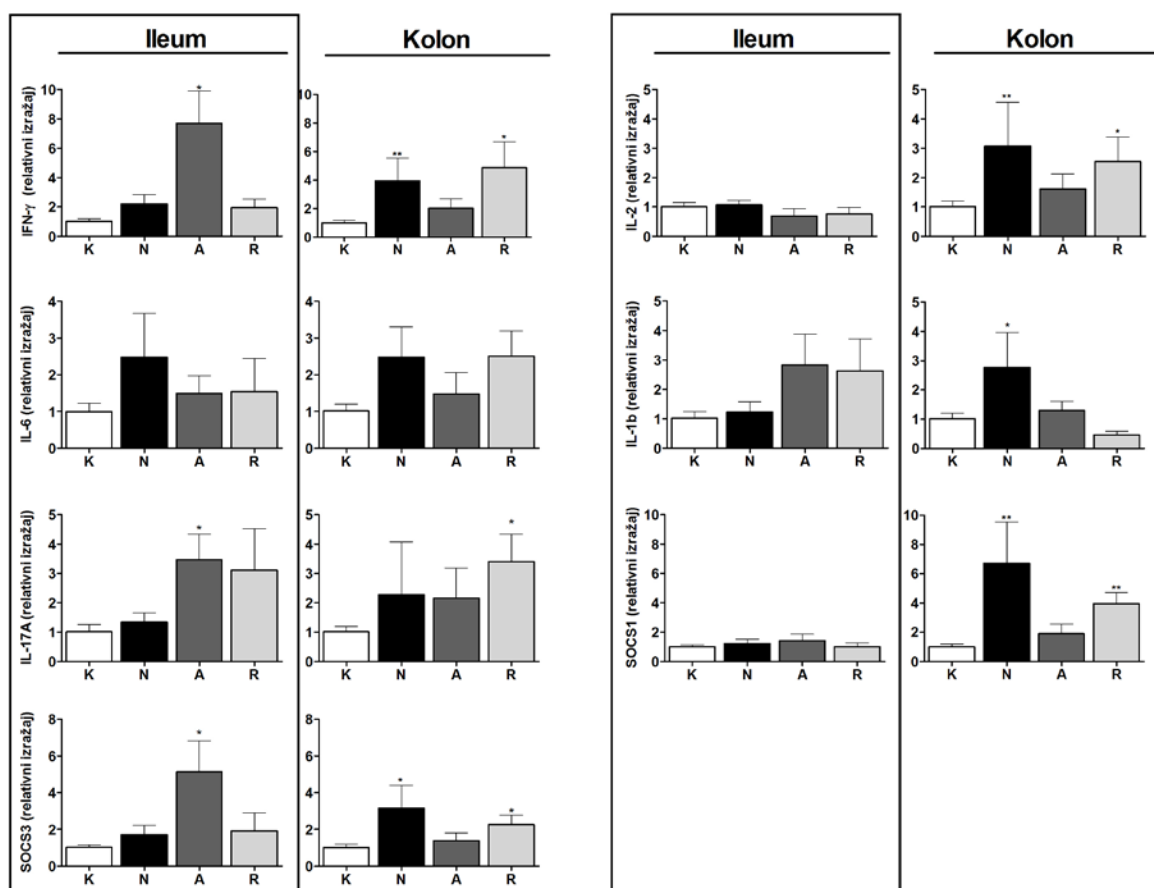
5.4. Odnos ekspresije citokina i molekula SOCS između bolesnika s upalnim bolestima crijeva i zdravih ispitanika

5.4.1. Analiza ekspresije citokina i molekula SOCS kod odraslih

Kako su upalne bolesti crijeva okarakterizirane kroničnom upalom i pretjeranom proizvodnjom brojnih citokina, usporedili smo ekspresiju mRNA za citokine i molekule SOCS između zdravih ispitanika i triju grupa oboljelih od upalnih bolesti crijeva na lokacijama terminalni ileum i zavijeno crijevo.

Dobiveni rezultati ne ukazuju na razlike u ekspresijama ispitivanih upalnih medijatora na upaljenom tkivu neliječene grupe s CB-om u odnosu na zdrave ispitanike (**Slika 13.**). Međutim, uvođenjem terapije dolazi do prolaznog povišenja razina *IFN- γ* (7,7x viša ekspresija) i *IL-17A* (3,5x viša ekspresija), koje ostaju povišene i u remisiji. Primijećen porast u razinama za *IFN- γ* i *IL-17A* u liječenoj grupi s CB-om prati i povišenje razine njihovog negativnog regulatora *SOCS3* (5x viša ekspresija). Također, u remisiji se ekspresije ispitivanih molekula ne razlikuju značajno od zdravih ispitanika. Nismo pronašli razlike u mRNA niti za *IL-6*, *IL-1 β* i *SOCS1* između definiranih grupa oboljelih i zdravih ispitanika.

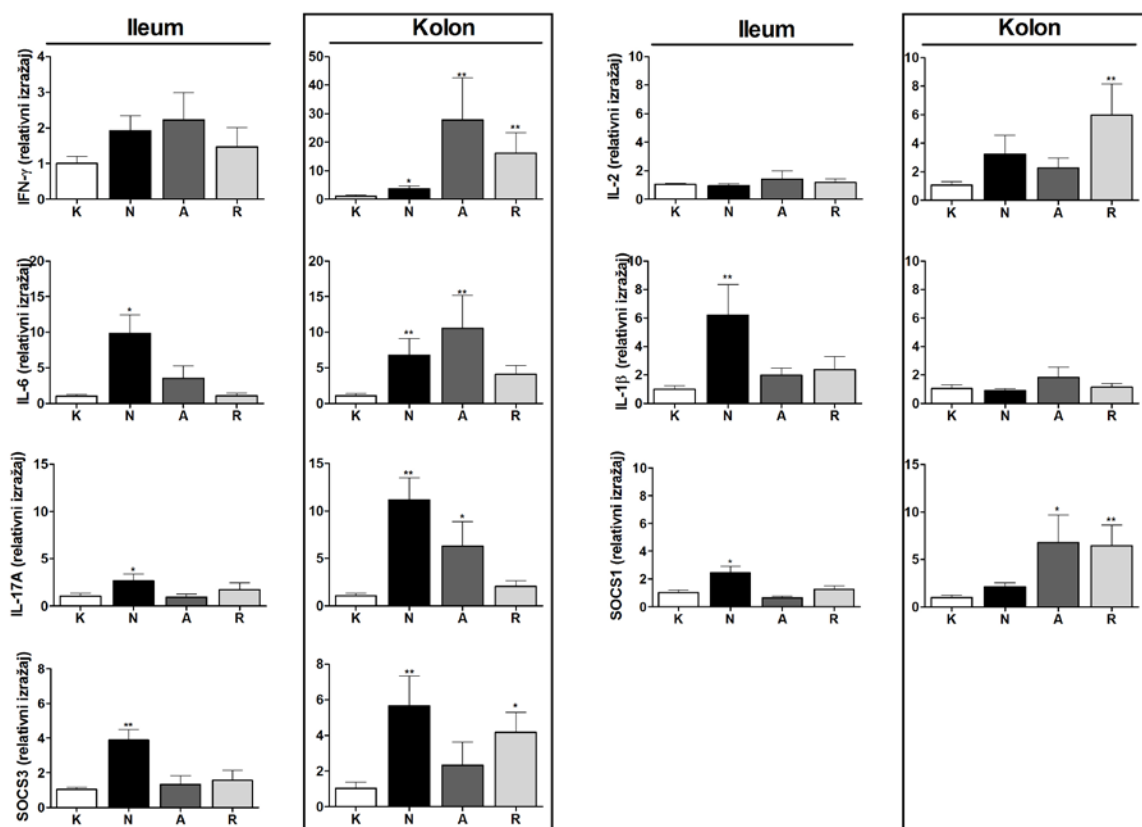
Međutim, na neupaljenom kolonu pronašli smo povišene razine *IFN- γ* , *IL-2* i *IL-1 β* u neliječenoj grupi bolesnika s CB-om, s jasnim snižavanjem na razinu zdravih ispitanika nakon uvođenja terapije (**Slika 13.**). U remisiji bolesti su razine *IFN- γ* i *IL-2* povišene, dok je ekspresija *IL-1 β* nepromjenjena u odnosu na zdrave ispitanike. Također smo pronašli povišenu razinu *IL-17A*, ali statistička značajnost je postignuta samo u remisiji bolesti (3.4x viša ekspresija). Kao i na upaljenom ileumu, i na nezahvaćenom kolonu nismo pronašli razlike u ekspresiji *IL-6* između definiranih grupa oboljelih i kontrola. Ekspresije *SOCS1* i *SOCS3* pratile su isti uzorak pronađen za *IFN- γ* i *IL-2*, s višim razinama u neliječenoj grupi, sniženim u liječenoj grupi i ponovno povišenim u remisiji. U usporedbi za upaljenim ileumom, razina *SOCS1* na nezahvaćenom kolonu je značajno povišena.



Slika 13 Ekspresija citokina i SOCS molekula u tkivu ileuma i kolona bolesnika s CB-om. Vrijednosti ekspresija normalizirane su prema genu za *GAPDH* i prikazane u odnosu na odgovarajuće lokacije kontrola. Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost \pm SEM. Biološki značajne razlike prikazane su s * $P < 0,05$ i ** $P < 0,01$. Analiza ekspresije svakog gena provedena je u triplicatu. Crni stupići = N grupa (neliječeni); Tamno sivi stupići= A grupa (liječeni); Svjetlosivi stupići= R grupa (remisija); Bijeli stupići= kontrole; uokvireno= upaljeno tkivo.

Za razliku od tkiva bolesnika s CB-om, na upaljenom tkivu bolesnika s UK-om razina *IFN-γ* viša je u sve tri definirane grupe u odnosu na zdrave ispitanike (3,7x za N, 28x za A i 16x za R grupu). Također su pronađene povišene razine *IL-6* i *IL-17A* u obje grupe s aktivnom upalom (7x i 11x za *IL-6*, odnosno 11x i 6,3x za *IL-17A*). Ekspresija *IL-1β* nije se značajno razlikovala među definiranim grupama. Razina *SOCS1* je 4x viša u sve tri definirane grupe, dok je razina *SOCS3* povišena u neliječenoj grupi i remisiji (5,7x odnosno 4,2x višaekspresija). Ekspresija *IL-2* nije se razlikovala od zdravih ispitanika za vrijeme aktivne upale, dok su u remisiji razine *IL-2* više čak 8x (**Slika 14.**).

Nezahvaćeni ileum bolesnika s UK-om pokazuje povišene razine *IL-6*, *IL-1 β* i *IL-17A* u neliječenoj grupi (9,8x, 6,2x odnosno 2,7x viša ekspresija). Obje molekule SOCS također imaju 2x višu razinu u neliječenoj grupi u odnosu na zdrave ispitanike (**Slika 14.**). Nisu pronađene razlike u ekspresijama za *IFN- γ* i *IL-2* među definiranim grupama na nezahvaćenom tkivu bolesnika s UK-om.



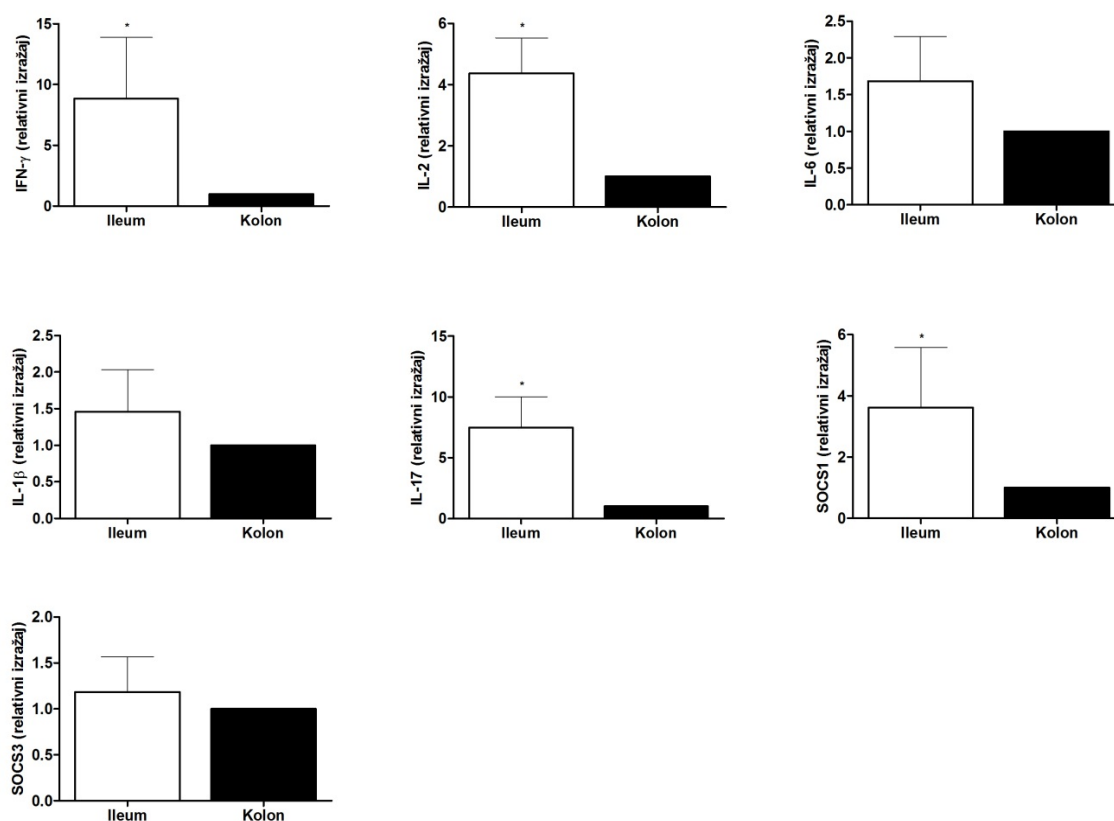
Slika 14. Ekspresija citokina i SOCS molekula u tkivu kolona i ileuma bolesnika s UK-om. Vrijednosti ekspresija normalizirane su prema genu *za GAPDH* i prikazane u odnosu na odgovarajuće lokacije kontrola. Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost \pm SEM. Biološki značajne razlike prikazane su s * $P < 0,05$ i ** $P < 0,01$. Analiza ekspresije svakog gena provedena je u triplicatu. Crni stupići = N grupa (neliječeni); Tamno sivi stupići = A grupa (liječeni); Svjetlosivi stupići = R grupa (remisija); Bijeli stupići = kontrole; uokvireno = upaljeno tkivo.

Da bismo vidjeli mijenja li se ekspresija ispitivanih transportera na upaljenom tkivu ovisno o ekspresiji ispitivanih citokina, proveli smo korelacijsku statističku analizu. Dobivene korelacije pokazuju da bolesnici s UK-om koji su imali višu razinu *IL-2* su ujedno imali i višu razinu *MDR1* i *BCRP*-a ($r = 0,72$, $P = 0,0148$, odnosno $r = 0,75$, $P = 0,0114$). Suprotno tome,

bolesnici s višim vrijednostima razine *IL-6* imali su niže razine *MDR1* u slučaju UK ($r = -0,667$, $P = 0,0315$). Zanimljivo je da je mRNA ekspresija *MRP1* kod ispitanika s UK-om pozitivno korelirala s ekspresijom *IFN- γ* ($r = 0,654$, $P = 0,0065$).

5.4.2. Analiza ekspresije citokina i molekula SOCS kod djece

Budući da upala utječe na ekspresiju nekih ABC transportera odlučili smo izmjeriti ekspresiju *IFN- γ* , *IL-2*, *IL-6*, *IL-1 β* , *IL-17A*, *SOCS1* i *SOCS3* u 15 kontrola, te dobivene vrijednosti za citokine usporediti kod tri definirane grupe oboljelih od CB-a i UK-a. Ekspresija molekula je mjerena na terminalnom ileumu i silaznom crijevu. Najprije smo odredili razlike u razini bazalne ekspresije upalnih medijatora od interesa kod zdravih ispitanika. Razine *IFN- γ* , *IL-2*, *IL-17A* i *SOCS1* su bile više u ispitivanom tkivu ileuma u odnosu na kolon. Nismo pronašli razlike u bazalnoj ekspresiji za *IL-6*, *IL-1 β* i *SOCS3* između ileuma i kolona (Slika 15.).

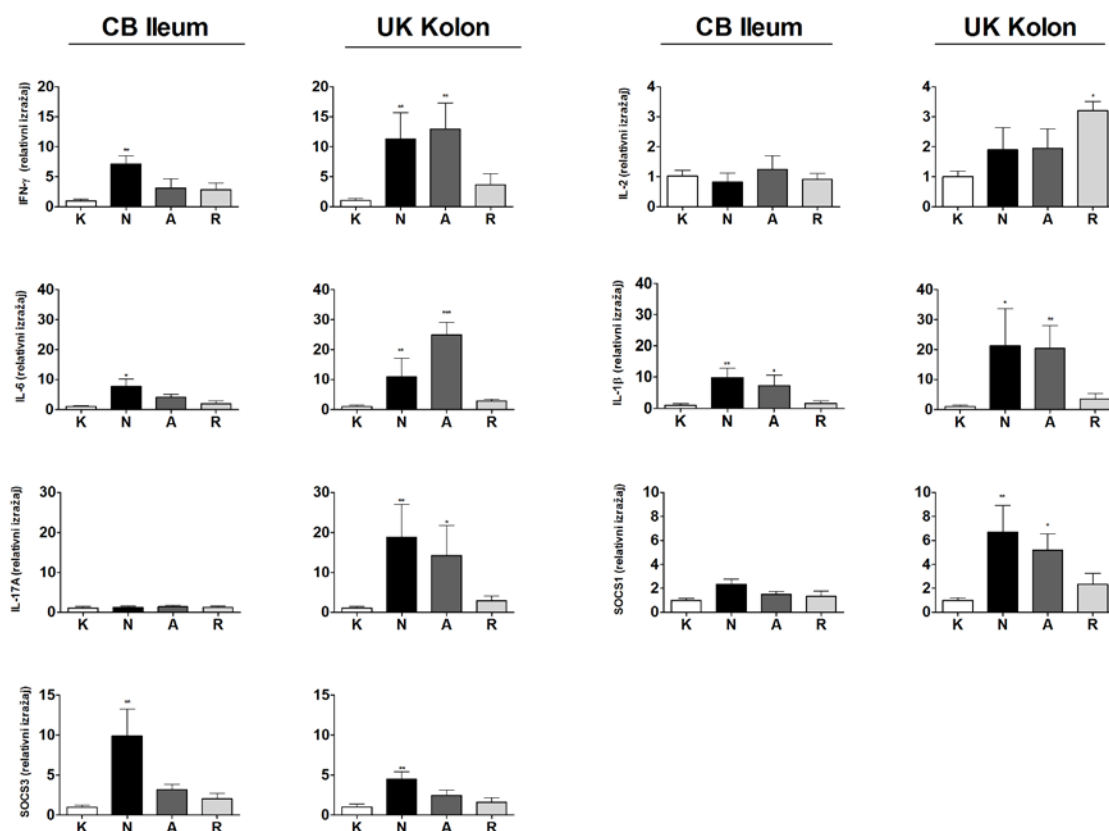


Slika 15. Ekspresija citokina i molekula SOCS u zdrave djece. Vrijednosti ekspresija normalizirane su prema genu za *GAPDH* i prikazane u odnosu na kolon. Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost \pm SEM. Biološki značajne razlike prikazane su s * $P < 0,05$.

Analiza ekspresije svakog gena provedena je u triplikatu. Crni stupići = kolon; Bijeli stupići = terminalni ileum.

Kod djece s CB-om, upaljeni ileum povezan je s povišenim razinama sljedećih citokina u odnosu na zdrave ispitanike: *IFN- γ* (7x viša ekspresija), *IL-6* (7,6x viša ekspresija) i *SOCS3* (~10 viša ekspresija). Dodatno, pokazalo se da *IL-1 β* ima 7x višu razinu ne samo u neliječenoj, već i u liječenoj grupi. Također, rezultati pokazuju da se ekspresije povišenih citokina smanjuju s terapijom, te da najnižu razinu imaju u remisiji gdje su dobivene vrijednosti u rasponu zdravih ispitanika (**Slika 16.**). Slične smo rezultate dobili i za djecu s UK-om. U neliječenoj i liječenoj grupi dobili smo povišene vrijednosti razina za *IFN- γ* (više od 11x), *IL-6* (više od 10x) i *IL-1 β* (više od 20x), dok je razina *SOCS3* značajno povišena samo u neliječenoj grupi (4,4x).

Nadalje, suprotno nalazima kod djece s CB-om gdje nismo dobili razliku u ekspresiji za *IL-17A* između tri definirane grupe oboljelih, kod djece s UK-om razina *IL-17A* je 14x viša u neliječenoj i liječenoj grupi. Ekspresija *IL-2* nije se razlikovala među definiranim grupama djece s CB-om, dok je kod djece s UK-om bila 3x viša u remisiji bolesti.



Slika 16. Ekspresija citokina i molekula SOCS u upaljenom tkivu djece s UBC-om.

Vrijednosti ekspresija normalizirane su prema genu za *GAPDH* i prikazane u odnosu na odgovarajuće lokacije kontrole. Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost \pm SEM. Biološki značajne razlike prikazane su s * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ i *** $P < 0,001$. Analiza ekspresije svakog gena provedena je u triplikatu. Crni stupići = N grupa (neliječeni); Tamno sivi stupići = A grupa (liječeni); Svjetlosivi stupići = R grupa (remisija); Bijeli stupići = kontrole; CB = Crohnova bolest; UK = ulcerozni kolitis.

S ciljem određivanja utjecaja ekspresije upalnih citokina na opaženo sniženje ekspresije transportera u upaljenom tkivu, napravili smo statističku analizu korelacija (**Tablica 4.**). Rezultati koje smo dobili upućuju na negativnu povezanost ekspresija za *MDR1* i *BCRP*-a te *IFN- γ* , *IL-6* i *IL-1 β* kod CB-a, dok smo kod UK-a dobili negativnu povezanost između ekspresija *MDR1* te *IFN- γ* , *IL-6* i *IL-1 β* . Suprotno *MDR1* i *BCRP*-u, za *MRP1* nismo pronašli povezanost s ekspresijama ispitivanih citokina.

Tablica 4. Korelacijska analiza ekspresija citokina, molekula SOCS i ABC transportera u upaljenom tkivu djece s UBC-om.

	CB			UK		
	<i>MDR1</i>	<i>MRP1</i>	<i>BCRP</i>	<i>MDR1</i>	<i>MRP1</i>	<i>BCRP</i>
<i>IFN-γ</i>	r= - 0,52 <i>P</i> = 0,0056	nz	r= - 0,58 <i>P</i> = 0,002	r= - 0,71 <i>P</i> = 0,0005	ns	ns
<i>IL-2</i>	r= 0,61 <i>P</i> = 0,001	nz	r= 0,58 <i>P</i> = 0,0019	nz	nz	nz
<i>IL-6</i>	r= - 0,57 <i>P</i> = 0,0033	nz	r= - 0,68 <i>P</i> = 0,0005	r= - 0,66 <i>P</i> = 0,0029	nz	nz
<i>IL-1β</i>	r= - 0,71 <i>P</i> < 0,0001	nz	r= - 0,61 <i>P</i> = 0,001	r= - 0,56 <i>P</i> = 0,0089	nz	nz
<i>IL17</i>	nz	nz	nz	nz	nz	nz
<i>SOCS1</i>	nz	nz	nz	nz	nz	nz
<i>SOCS3</i>	r= - 0,69 <i>P</i> = 0,0001	nz	r= - 0,68 <i>P</i> = 0,0001	r= - 0,53 <i>P</i> = 0,0116	nz	nz

nz* = nije značajno. CB= Crohnova bolest; UK= ulcerozni kolitis; r= Spearmanov koeficijent korelacije; *P*= statistička značajnost.

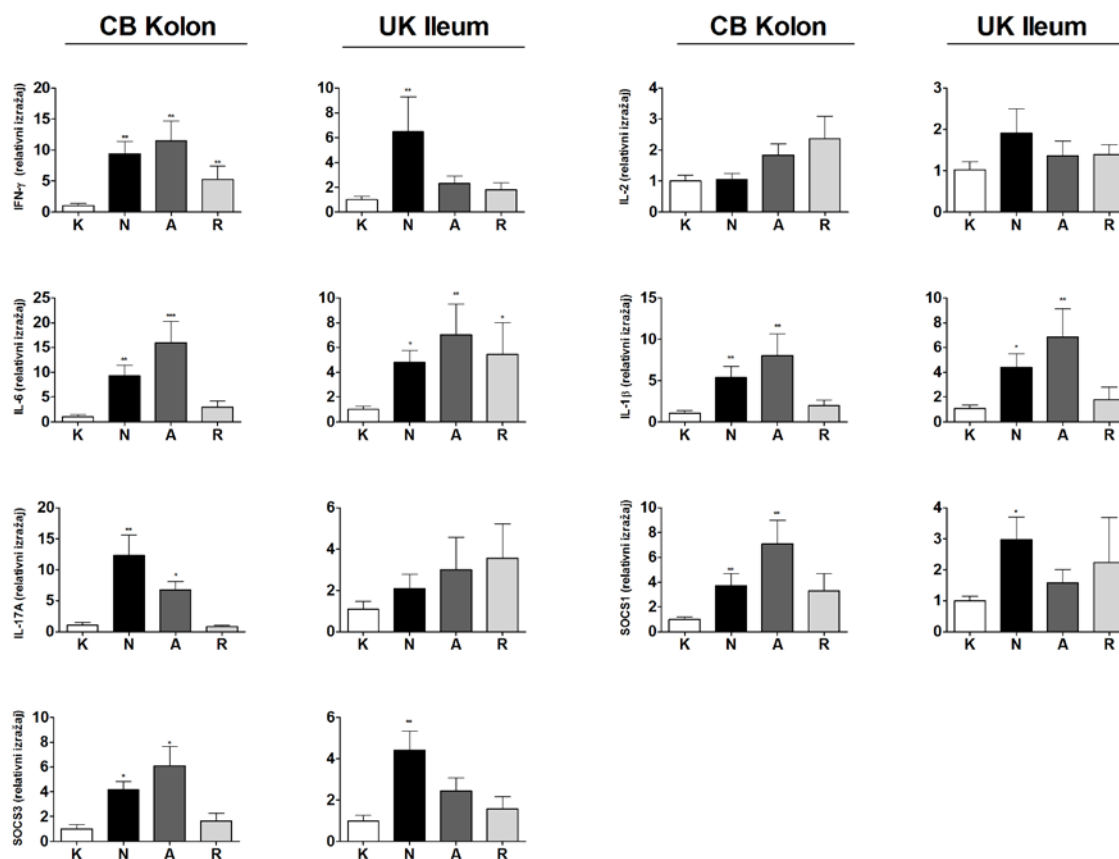
Na neupaljenom tkivu bolesnika s CB-om i UK-om snižena razina *MDR1* nije pokazala povezanost s ekspresijama ispitivanih citokina. Nadalje, vrijednosti ekspresija upalnih citokina na upaljenom tkivu CB-a i UK-a pokazale su pozitivnu povezanost s aktivnosti bolesti, tj. bolesnici s težom kliničkom slikom imali su i više vrijednosti ekspresija upalnih citokina i obratno (**Tablica 5.**).

Tablica 5. Korelacijska analiza upalnih citokina i aktivnosti bolesti kod djece oboljele od UBC-a.

	CB		UK
PCDAI		PUCAI	
<i>IL-1β</i>	r= 0,5781 P= 0,0019	<i>IL-6</i>	r= 0,7258 P=0,0057
		<i>IL-1β</i>	r= 0,6125 P= 0,013
		<i>IL-17</i>	r= 0,7339 P=0,0051

PCDAI= Pedijatrijski indeks aktivnosti CB-a; PUCAI= Pedijatrijski indeks aktivnosti UK-a; CB= Crohnova bolest; UK= ulcerozni kolitis; r= Spearmanov koeficijent korelacije; P= statistička značajnost

Na nezahvaćenom kolonu djece s CB-om pronašli smo povišene razine svih medijatora upale od interesa. Tako *IFN- γ* ima >5x višu razinu u sve tri definirane grupe u odnosu na zdravu djecu (**Slika 17.**). Kod neliječene i liječene grupe također su pronađene povišene vrijednosti za *IL-6* (>9x), *IL-1 β* (>5x), *IL-17A* (>6,7x), *SOCS1* (>3,7x) te *SOCS3* (>4x). Kao što je vidljivo, suprotno rezultatima na upaljenom ileumu bolesnika s CB-om gdje se ekspresija *IL-17A* nije razlikovala među grupama, na nezahvaćenom kolonu ona pokazuje povišenu razinu. U slučaju bolesnika s UK-om, na nezahvaćenom ileumu pronašli smo povišene razine *IFN- γ* (6,5x), *SOCS1* (3x) i *SOCS3* (4,4x) u nelijećenoj grupi. Razina *IL-6* i *IL-1 β* viša je u nelijećenoj i lijećenoj grupi (>4,8x odnosno >4,4x) dok je razina *IL-6* bila viša čak i u remisiji (5,5x) (**Slika 17.**).



Slika 17. Ekspresija citokina i molekula SOCS u nezahvaćenom tkivu djece s UBC-om.

Vrijednosti ekspresija normalizirane su prema genu za *GAPDH* i prikazane u odnosu na odgovarajuće lokacije kontrola. Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost \pm SEM. Biološki značajne razlike prikazane su s $*P < 0,05$ i $**P < 0,001$. Analiza ekspresije svakog gena provedena je u triplicatu. Crni stupići = N grupa (neliječeni); Tamno sivi stupići = A grupa (liječeni); Svjetlosivi stupići = R grupa (remisija); Bijeli stupići = kontrole; CB = Crohnova bolest; UK = ulcerozni kolitis.

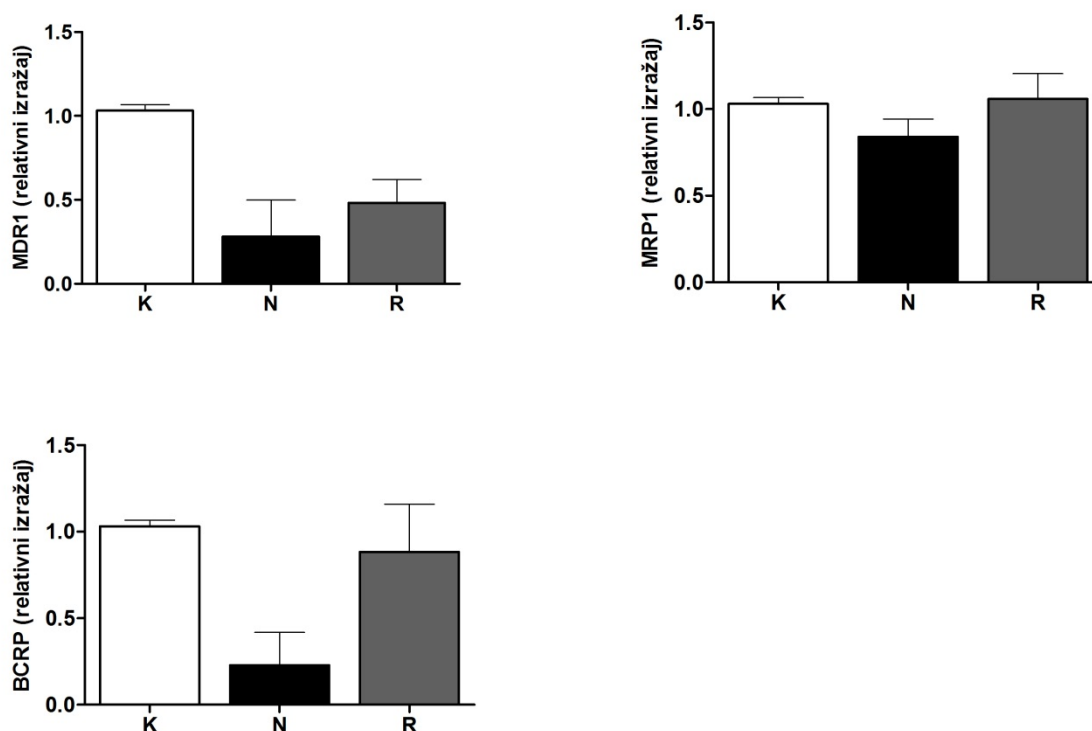
5.5. Praćenje tijeka liječenja bolesnika s ulceroznim kolitisom

Cilj ovog dijela ispitivanja bio je da se utvrdi mijenja li se ekspresija ispitivanih molekula tokom terapije do trenutka u kojem bolesnici ulaze u remisiju. Ukupno su praćena četiri bolesnika s UK-om od kojih su tri imala isti tijek bolesti i označeni su kao Slučaj 1, a preostali bolesnik kao Slučaj 2. Bolesnici u Slučaju 1 su ušli u remisiju četiri mjeseca nakon što im je postavljena dijagnoza i terapije aminosalicilatima. Prateći promjene u ekspresiji molekula od interesa vidjelo se da one prate isti „uzorak“ promjena što je dodatno omogućilo

svrstavanje tih triju bolesnika u istu grupu. Bolesnik označen kao Slučaj 2 je tri mjeseca nakon postavljanja dijagnoze i primitka terapije i dalje imao aktivnu upalu, a remisiju je dostigao nakon ukupno šest mjeseci terapije. Međutim, šest mjeseci nakon dostizanja remisije bolesnik je ušao u relaps. Dakle, za razliku od Slučaja 1 u kojem smo imali samo dvije točke praćenja, u Slučaju 2 imamo četiri točke praćenja.

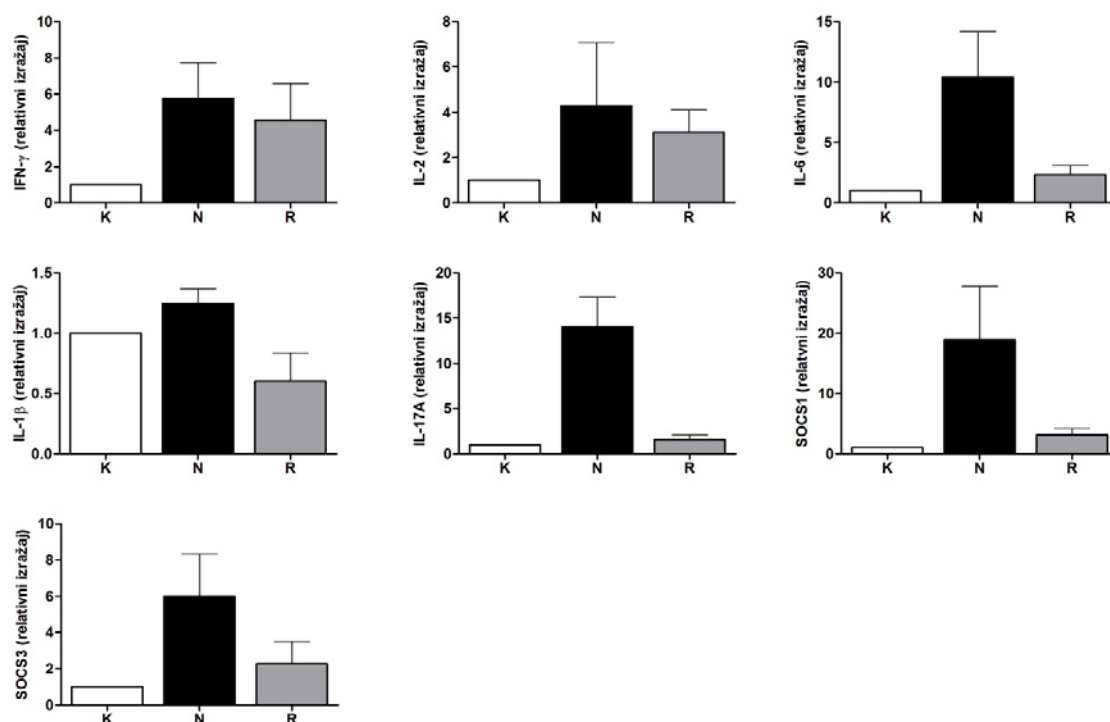
5.5.1. Slučaj 1

Rezultati praćenja tijeka bolesti u Slučaju 1 pokazuju da je razina *MDR1* u remisiji nešto viša u odnosu na trenutak postavljanja dijagnoze, ali i dalje niža u odnosu na zdrave ispitanike. Ekspresija *MRP1* se nije bitno mijenjala tokom praćenja, dok je razina *BCRP*-a u trenutku postavljanja dijagnoze niska i prolaskom upale raste na razinu zdravih ispitanika. (Slika 18.).



Slika 18. Ekspresija ABC transportera na upaljenom tkivu u Slučaju 1 praćenja tijekom liječenja. Vrijednosti ekspresija normalizirane su prema genu za *GAPDH* i prikazane u odnosu na ekspresiju u trenutku postavljanja dijagnoze (neliječeno). Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost \pm SEM. Analiza ekspresije svakog gena provedena je u triplicatu. Crni stupići = N grupa (neliječeno); Tamno sivi stupići = R grupa (remisija); Bijeli stupići = kontrole.

Razina ispitivanih citokina i molekula SOCS snižava se uvođenjem terapije i rezolucije upale, te je u remisiji niža nego u trenutku postavljanja dijagnoze, ali su vrijednosti još uvijek su nešto više nego kod zdravih ispitanika. Izuzetak su razine za *IL-6*, *IL-17A* i *SOCS1* koje se u remisiji vraćaju na kontrolne vrijednosti, dok je razina *IL-1 β* čak i niža (Slika 19.).



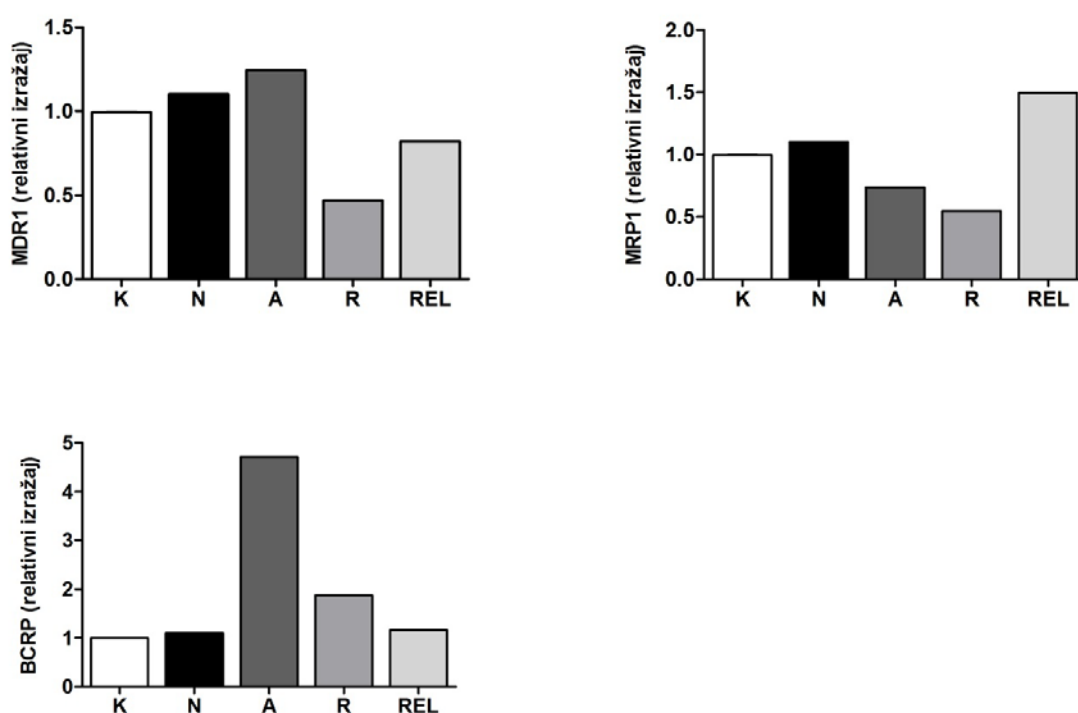
Slika 19. Ekspresija citokina i SOCS molekula u Slučaju 1 praćenja tijekom liječenja. Vrijednosti ekspresije normalizirane su prema genu za *GAPDH* i prikazane u odnosu na ekspresiju u trenutku postavljanja dijagnoze (neliječeno). Vrijednosti su prikazane kao srednja vrijednost \pm SEM. Analiza ekspresije svakog gena provedena je u triplicatu. Crni stupići = N grupa (neliječeno); Svijetlosivi stupići = R grupa (remisija); Bijeli stupići = kontrole.

5.5.2. Slučaj 2

Rezultati praćenja tijekom bolesti u Slučaju 2 pokazuju da je razina *MDR1* nešto viša od zdravih kontrola u trenutku postavljanja dijagnoze, no uvođenjem terapije dolazi do postupnog snižavanja njegove ekspresije, te se najniže vrijednosti postižu u remisiji.

Međutim, iako niža i od kontrola i od početne točke praćenja, ekspresija *MDR1* u točki relapsa pokazuje tendenciju povišenja prema zdravim ispitanicima.

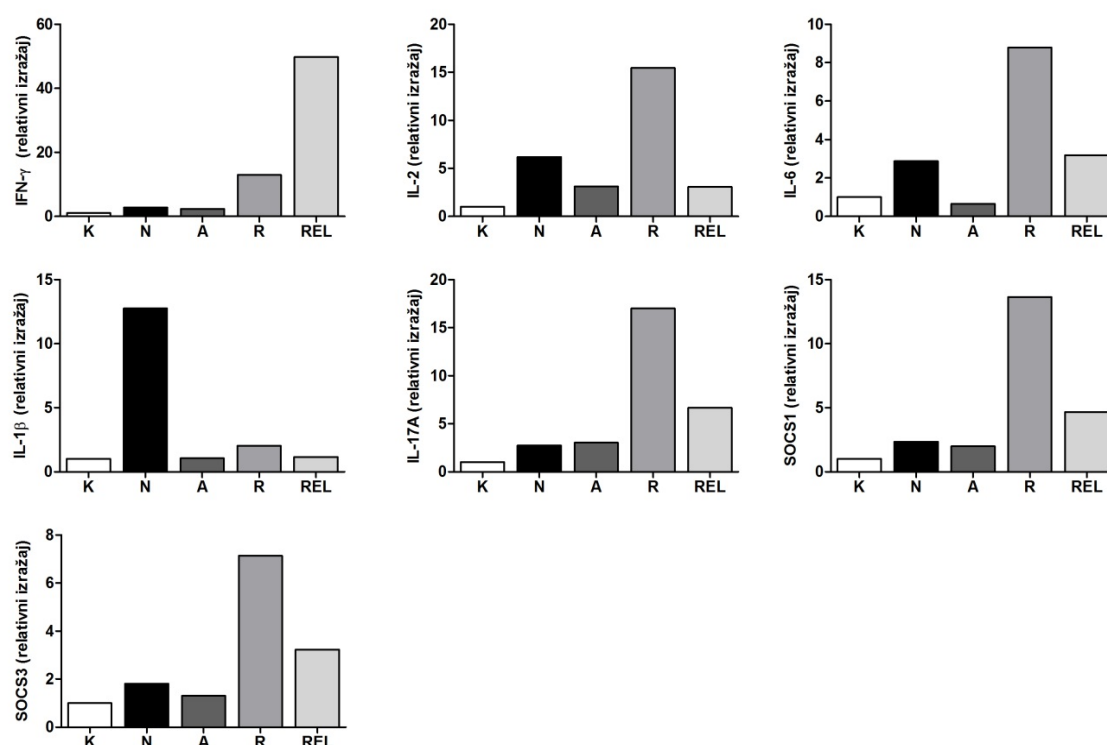
Slično, razina *MRP1* se postepeno snižavala nakon postavljanja dijagnoze i uvođenja terapije, te je ujedno i nešto niža u odnosu na zdrave ispitanike. Međutim, u točki relapsa dolazi do naglog povišenja *MRP1* ekspresije, koja je viša u odnosu na zdrave ispitanike i izmjerene vrijednosti kod postavljanja dijagnoze. Najzanimljivije otkriće je da razina *BCRP*-a u relapsu pada na razinu u trenutku postavljanja dijagnoze, dok je u točki primitka terapije i u remisiji viša nego u trenutku postavljanja dijagnoze i zdravih ispitanika (**Slika 20.**).



Slika 20. Ekspresija ABC transportera u Slučaju 2 praćenja tijekom liječenja. Vrijednosti ekspresija normalizirane su prema genu za *GAPDH* i prikazane u odnosu na ekspresiju trenutku postavljanja dijagnoze (neliječeno). Analiza ekspresije svakog gena provedena je u triplicatu. Crni stupići = N grupa (neliječeno); Tamno sivi stupići= A grupa (tretirano); Srednje sivi stupići= R grupa (remisija); Svijetlo sivi stupići = relaps; Bijeli stupići= relaps.

Ekspresija IL-2 i IL-1 β u Slučaju 2 u trenutku postavljanja dijagnoze viša je nego kod zdravih ispitanika. Međutim, dok su u Slučaju 1 vrijednosti razina ispitivanih molekula u remisiji niže u odnosu na trenutak postavljanja dijagnoze, u Slučaju 2 dobili smo suprotne

rezultate, odnosno razine ispitivanih molekula pokazuju najviše vrijednosti u remisiji. Također, razine *IFN- γ* , *IL-17A* i obje molekule SOCS su više i u točki relapsa u odnosu na prve dvije točke praćenja. Izuzetak od zapaženog je *IL-1 β* čija je razina najviša u trenutku postavljanja dijagnoze, te je uvođenjem terapije i ulaska u remisiju, ali i nakon relapsa, njegova ekspresija blizu razine zdravih ispitanika (Slika 21.).



Slika 21. Ekspresija citokina i molekula SOCS u Slučaju 2 praćenja tijekom liječenja.

Vrijednosti ekspresija normalizirane su prema genu za *GAPDH* i prikazane u odnosu na ekspresiju u trenutku postavljanja dijagnoze (neliječeno). Analiza ekspresije svakog gena provedena je u triplicatu. Crni stupići = N grupa (neliječeno); Tamno sivi stupići = A grupa (tretirano); Svijetlosivi stupići = R grupa (remisija); Bijeli stupići = relaps.

6. RASPRAVA

Netaknuta crijevna barijera važna je za održavanje crijevne homeostaze u čijem održavanju sudjeluju i ABC transporteri. Njihova uloga u upalnim bolestima crijeva je kontroverzna i do danas samo je nekoliko istraživanja odredilo profile ekspresija više ABC transportera istodobno. Istraživanje koju su proveli Zimmerman i sur. [202] uključivalo je uzorke tkiva od duodenuma do zavijenog crijeva na kojima su određene ekspresije *MDR1* i *MRP1-5*, no nedostatak ovog istraživanja je taj što su ekspresije određene samo kod zdravih ispitanika.

U našem smo istraživanju odredili profile mRNA ekspresija za gene *MDR1*, *MRP1* i *BCRP*-a od terminalnog ileuma do ravnog crijeva kod odraslih, te na terminalnom ileumu i silaznom crijevu kod pedijatrijskih ispitanika, koji su bolovali od CB-a i UK-a, odnosno zdravih ispitanika. Na temelju dobivenih rezultata proizlazi da je profil ekspresija triju ispitivanih ABC transportera sličan kod zdravih kontrola te odraslih i djece s UBC-om (**Slika 7.-8.**). Točnije, *MDR1* i *BCRP* pokazuju najvišu razinu na terminalnom ileumu, te nižu i konstantnu razinu duž kolona i ravnog crijeva, dok se ekspresija *MRP1* ne razlikuje duž ispitivanih lokacija što je u skladu s rezultatima mjerenja prijašnjih istraživanja [4, 203].

Razina *MDR1* je generalno snižena, u odnosu na zdrave ispitanike, u obje etiologije upalnih bolesti crijeva kod odraslih i djece neovisno o stadiju bolesti (**Slika 9.**). Međutim, usporedna analiza ekspresija *MDR1* na tkivu nezahvaćenom bolesti pokazala je sniženu razinu i to kod CB-a na kolonu djece (**Slika 12.**), ali ne i odraslih, te kod UK-a na ileumu odraslih (**Slika 10.**), ali ne i djece. Ovaj neočekivani nalaz isključuje upalni proces kao jedini čimbenik koji posljedično doprinosi sniženju *MDR1* razine te upućuje na izravnu ulogu *MDR1* u patogenezi UBC-a. Posljedica snižene *MDR1* razine na patologiju UBC-a potvrđena je u istraživanju na miševima *mdr1a*^{-/-} koji spontano razvijaju crijevnu upalu [180], što znači da gubitak kapaciteta crijeva za izbacivanjem tvari iz stanica putem MDR1 može doprinijeti razvoju kolitisa. Osim uloge u transportu različitih ksenobiotika, pokazano je da MDR1 posreduje u adheziji bakterija na enterocite, smanjujući rizik nastanka probavnih poremećaja [204]. Imunomodulatorna aktivnost MDR1 može se povezati s funkcijom REG3G (engl. *regenerating islet-derived protein 3 gamma*) proteina budući da miševi *mdr1a*^{-/-} istovremeno pokazuju njegovu sniženu ekspresiju u sluznici crijeva [205]. Pokazano je da REG3G aktivno sprječava prekomjernu upalu uslijed baktericidne aktivnosti i blokade proizvodnje citokina [206]. Međusobno djelovanje MDR1 i REG3G u održavanju ravnoteže crijevne homeostaze

još uvijek nije poznato, ali oboje su regulirani mikrobnom kolonizacijom [207]. Snižena *MDR1* razina na ileumu je u suprotnosti s povišenom razinom REG3G u bolesnika s CB-om i pretpostavlja različite regulatorne mehanizme [206]. Također, poznato je da sulfasalazin, korišten u liječenju UBC-a, inhibira signalizaciju NFκB što bi moglo objasniti sniženu razinu *MDR1* u liječenoj grupi i remisiji, budući da NFκB ima ulogu u regulaciji *MDR1* ekspresije [208]. U miševa *mdr1*^{-/-} s izraženom upalom crijeva dolazi do patološke slike koja uključuje pojačanu infiltraciju upalnih stanica, produkciju IL-1β i aktivnost mijeloperoksidaza (MPO, engl. Myeloperoxidase) [209] što su ujedno i karakteristike kolitisa kod ljudi. Osim važne uloge MDR1 u mehanizmima urođene imunosti, nedavno istraživanje pokazalo je da inducibilni limfociti Treg (od engl. regulatory T cells) imaju smanjenu aktivnost supresije u odsutstvu MDR1 [210] što upućuje na aktivnu ulogu MDR1 u mehanizmima regulacije specifične imunosti.

Dobiveni rezultati snižene razine *MDR1* u upaljenom epitelu bolesnika s UBC-om slažu se s rezultatima drugih istraživanja [6, 203, 211, 212]. Englund i sur. [213] su utvrdili sniženje *MDR1* razine na upaljenom tkivu bolesnika s UK-om. U istom istraživanju, pokazano je da se u remisiji ekspresija MDR1 vraća na razinu zdravih ispitanika što je suprotno našim nalazima i ne može se objasniti bez obzira na slične karakteristike bolesnika, njihov broj i lokaciju uzorkovanja tkiva za analizu. Paralelna analiza ekspresije MDR1 kod djece i odraslih bolesnika s UK-om rezultirala je gotovo jednakim nalazima (**Slika 9. i 11.**). Međutim, apsolutna potvrda promjena u ekspresiji MDR1 ovisno o stadiju bolesti pružila bi analiza većeg broja bolesnika s UK-om odnosno potvrda nalaza na proteinskoj razini.

Našim istraživanjem po prvi puta pokazujemo da je *MDR1* razina snižena kroz različite stadije bolesti na upaljenom dijelu crijevne sluznice pedijatrijskih ispitanika s UBC-om, što ukazuje na njegovu sveukupnu redukciju neovisno o dobi bolesnika.

Za razliku od *MDR1*, kod odraslih oboljelih od CB-a razina *BCRP*-a na upalno promijenjenom ileumu granično je snižena u neliječenoj grupi, te dodatno u liječenoj grupi (**Slika 9.**), dok je kod pedijatrijskih ispitanika s CB-om snižena samo u neliječenoj grupi te se uvođenjem terapije i ulaskom u remisiju njegove razine normaliziraju na one zdravih kontrola (**Slika 11.**). Ovi podaci potencijalno ukazuju na uključenost *BCRP*-a u patogenezu pedijatrijskog CB-a i isključuju upalni proces kao jedini čimbenik koji doprinosi opaženom sniženju razine budući da je u liječenoj grupi upala još uvijek prisutna s obzirom na povišene vrijednosti *IL-1β* ekspresije (**Slika 16.**). Suprotno pretpostavci da upalni citokini reguliraju

ekspresiju ABC transportera, moguć je i suprotan učinak. Poznato je da je BCRP odgovoran za izbacivanje ureata iz stanica [214–216] koji su jedan od proupalnih čimbenika budući da sudjeluju u aktivaciji inflammasoma i posljedično proizvodnji aktivnog IL-1 β . Prema tome, sniženje razine BCRP-a i viša razina IL-1 β mogu biti povezani s stalnom aktivacijom inflammasoma uslijed nemogućnosti stanica da eliminiraju kristale ureata [217–220]. Osim toga, BCRP direktno sudjeluje u upalnoj reakciji budući da snižena razina BCRP-a doprinosi pojačanoj aktivnosti NF- κ B i rezultira pojačanom proizvodnjom citokina, naglašenim oksidativnim stresom i pojačanim upalnim odgovorom [221].

Na nezahvaćenom kolonu bolesnika s CB-om nismo pronašli razlike u ekspresiji BCRP-a ni kod djece ni kod odraslih (**Slika 10. i Slika 12.**).

Kod UK-a pedijatrijski bolesnici nisu pokazivali promjene u ekspresiji BCRP-a na upalom zahvaćenoj niti nezahvaćenoj crijevnoj sluznici (**Slike 11.-12.**), dok je kod odraslih ispitanika razina BCRP-a snižena za vrijeme aktivne upale na zahvaćenom dijelu kolona i normalizira se u remisiji na vrijednosti zdravih ispitanika (**Slika 9.**). Kao i kod CB-a, razina BCRP-a kod odraslih bolesnika s UK-om se dodatno snižava u liječevoj grupi što bi se moglo objasniti učinkom sulfasalazina, terapijika koji se koristi u liječenju UBC-a. Sulfasalazin povišuje razinu homocisteina te snižava razinu folata, budući da djeluje kao inhibitor folat reduktaze [222], uslijed čega dolazi do snižavanja ekspresije BCRP-a [223]. Međutim, to je u suprotnosti s pronađenom ekspresijom BCRP-a u remisiji koja je na razini zdravih ispitanika. Mogući razlog tomu je vrijeme izloženosti sulfasalazinu što rezultira kumulativnim povišenjem razine BCRP-a [224].

Također, pronašli smo da je razina BCRP-a snižena i na nezahvaćenom ileumu i duž kolona odraslih oboljelih od UK-a u novodijagnosticiranoj grupi (**Slika 10.**). To može objasniti povećanu proizvodnju citokina IL-6, IL-1 β i IL-17A (**Slika 14.**) [225], budući da BCRP ima sposobnost negativne regulacije NF κ B i inflammasoma [221]. Zanimljivo je da iako postoji povećana proizvodnja citokina, nije zapaženo oštećenje tkiva, što je vjerojatno rezultat povišene razine SOCS3 kao njihovog negativnog regulatora (**Slika 14.**) Nismo pronašli pojedinačne korelacije između ekspresija MDRI i BCRP-a te proupalnih citokina na nezahvaćenom terminalnom ileumu ispitanika s UK-om. Budući da u patologiji UBC-a sinergistički sudjeluju brojni čimbenici, potrebno je napraviti multifaktorijalne statističke analize za jednoznačno tumačenje. Nažalost, broj ispitanika uključenih u istraživanje ne zadovoljava kriterije za takvu obradu podataka.

Izgleda da je za sniženu razinu *BCRP*-a kod odraslih bolesnika s UBC-om odgovoran sam upalni proces, te se dolazi se do zaključka da *BCRP* najvjerojatnije nema ulogu u patogenezi UBC-a kod odraslih. Međutim, rezultati koje smo dobili praćenjem tijeka bolesti ispitanika koji je ušao u relaps govore u prilog mogućoj ulozi *BCRP*-a budući je ekspresija u relapsu jednaka onoj pri nastanku bolesti, dok je za vrijeme aktivne upale pod terapijom i u remisiji viša. Uloga *BCRP*-a u pedijatrijskom CB-u moguća, ali da bi se to potvrdilo, potrebna su dodatna istraživanja.

Istraživanja Englund i sur. [213] i Gutmann i sur. [226] također su potvrdila snižene razine *MDR1* i *BCRP*-a u upalom zahvaćenom dijelu sluznice ispitanika s UK-om, što je u skladu s našim rezultatima dobivenim na odraslim bolesnicima te ekspresiji *MDR1* kod djece. Međutim, ekspresija *BCRP*-a kod djece s UK-om u skupini novodijagnosticiranih bolesnika je tek pokazivala trend snižavanja u odnosu na zdrave ispitanike. Nadalje, Englund i sur. pokazuju da ne postoje razlike u razini *MDR1* između UK remisije i zdravih ispitanika dok smo mi pronašli granično značajno sniženje *MDR1* razine u pedijatrijskoj UK remisiji. Važno je za napomenuti da su rezultati ovih istraživanja provedeni na odraslim ispitanicima što bi moglo objasniti opažene razlike u rezultatima. Također, vidljivo je da je uz silazno crijevo terminalni ileum također mjesto gdje smo primijetili značajno sniženje razine *MDR1* i *BCRP* sukladno rezultatima istraživanja Langman i sur. [6], što je interesantno budući je ulcerozni kolitis uglavnom ograničen na kolon i samo manje razlike bi se očekivale na ileumu.

Poznato je da *BCRP* i *MRP1* sudjeluju u izbacivanju glutaciona (GSH) i njegovih konjugiranih oblika [227] zbog čega sudjeluju u održavanju unutarstaničnog redoks statusa. Snižene razine *MDR1* i *BCRP*-a nisu dio sveukupnog sniženja ekspresije ABC transportera budući da smo kod pedijatrijskih bolesnika s UK-om pronašli povišenu razinu *MRP1* i to na upalom zahvaćenom i nezahvaćenom dijelu crijevne sluznice (**Slike 11.-12.**). Ovi rezultati se djelomično slažu s rezultatima Blokzijl i sur. [228] koji su pronašli povišenu razinu *MRP1* u odraslih i predložili da bi *MRP1* mogao igrati zaštitnu ulogu u patogenezi UBC-a. Suprotno tome, mi nismo pronašli razlike u ekspresiji *MRP1* među definiranim grupama odraslih bolesnika s UK-om (**Slike 9.-10.**). Naši rezultati jasno pokazuju povišenu *MRP1* razinu samo u neliječenoj grupi pedijatrijskih bolesnika s UK-om, dok u prethodno spomenutom istraživanju nema podataka o tome da li su bolesnici bili novodijagnosticirani ili pod terapijom. Heijden i sur. [224] ukazuju da terapija sulfasalazinom snižava razinu *MRP1* i moguće objašnjava prolaznu normalizaciju *MRP1* ekspresije na razinu zdravih kontrola u

liječenoj grupi pedijatrijskih ispitanika s UK-om (**Slika 11.**). Dodatno, stimulacija mikroglija stanica rezultira povišenim razinama MRP1 i MRP5 [229] s objašnjenjem da povišena ekspresija predstavlja kompenzatorni odgovor na smanjenu funkciju što bi mogao biti slučaj i kod UK-a gdje je opisano smanjenje mukoznog GSH, kosupstrata MRP1 potrebnog za njegovo normalno funkcioniranje [230]. MRP1 pozitivno regulira izbacivanje LTC₄, kemokina koji dodatno može aktivirati dendritičke stanice [231]. LTC₄ povećava kapacitet DC-a za izlučivanje većih količina IL-23 i pomiče polarizaciju limfocita T u Th17 tip [232]. Sukladno, povišeni *MRP1* u neliječenoj grupi pedijatrijskog UK-a (**Slika 11.**) popraćen je povišenom razinom *IL-17A* (**Slika 16.**), i praćenjem kinetike nakon terapije ukazuje na pozitivnu ulogu MRP1 u ranoj patologiji UBC-a, no potrebna su dodatna istraživanja za jasnu procjenu njegove uloge u ranoj i kasnoj fazi bolesti. Ekspresija *MRP1* na upalom zahvaćenom dijelu crijevne sluznice nije se razlikovala među definiranim grupama ispitanika kod odraslih s UK-om (**Slika 9.**), kao ni kod djece s CB-om (**Slika 11.**). Njegova ekspresija kod odraslih s CB-om je snižena na upaljenoj sluznici u novodijagnosticiranoj grupi (**Slika 9.**) te se normalizira uvođenjem terapije i posljedičnim ulaskom u remisiju. Ovi rezultati ukazuju na različite uloge BCRP i MRP1 u razvoju bolesti ovisno o dobi bolesnika. Snižena razina *MRP1*, kao i *BCRP*-a, na tkivu ileuma u CB-u može utjecati na izbacivanje reaktivnih kisikovih radikala izvan stanice čime one postaju osjetljivije na apoptozu posredovanu ligandom Fas i LTC₄ [228, 233]. Nadalje, Hove i sur. [234] pokazuju da miševi *mrp1*^{-/-} razvijaju puno jači oblik bolesti nakon izlaganja dekstran-sulfatu uslijed ozbiljnih oštećenja epitela što potvrđuje zaštitnu ulogu MRP1 u patogenezi UBC-a.

Što se tiče razvoja rezistencije, nismo pronašli značajna povišenja u ekspresiji ispitivanih ABC transportera. Isto nismo niti očekivali obzirom da grupa bolesnika s aktivnom upalom koja je bila u procesu liječenja nije pokazivala naznake razvoja rezistencije naspram korištenih terapeutika. Nadalje, zbog tehničke nemogućnosti prikupljanja specifične grupe oboljelih koji pokazuju rezistenciju na uvedenu terapiju, bilo kakvo detaljnije zaključivanje o razvoju rezistencije i lokalnoj promjeni razina povezanih transportera bilo bi spekulativno. Međutim, za očekivati je da bi u grupi bolesnika s rezistencijom pronašli značajno povišenje razina *MDR1*, *BCRP*-a i *MRP1*. Slične rezultate objavili su Farell i sur. gdje su pokazali značajno povišenje razine *MDR1* u limfocitima periferne krvi ispitanika oboljelih od UBC-a koji nisu odgovorili na danu terapiju [149].

Praćenje tijeka bolesti odraslih ispitanika s UK-om omogućilo je analizu kinetike ekspresije ABC transportera i prouplanih citokina gdje u Slučaju 1 ekspresije svih triju

ispitivanih ABC transportera pokazuju već opisan trend, sa sniženim razinama *MDR1*, konstantnim *MRP1* i sniženim *BCRP*-om koji se normaliziraju u remisiji. Isto tako, ekspresije citokina i molekula SOCS u Slučaju 1 jasno pokazuju kako se njihove vrijednosti normaliziraju nakon uvođenja terapije i ulaska u remisiju. No, kod Slučaja 2 dobili smo suprotne rezultate. Ekspresija *MDR1* nije se razlikovala od kontrola u svim točkama liječenja, dok je *BCRP* bio najviši za vrijeme terapije, te se u remisiji vratio na razinu u trenutku postavljanja dijagnoze. Razina *MRP1* je povišena u točki relapsa, u trenutku kada pacijent ne odgovara na danu terapiju što bi moglo implicirati na moguću pojavu rezistencije putem povišene *MRP1* ekspresije, no da bi se to potvrdilo bilo bi potrebno daljnje praćenje liječenja tog ispitanika, što tehnički nije bilo moguće.

Jedan od mogućih uzroka za opaženo sniženje razine ispitivanih transportera mogao bi biti sam upalni proces, tj. povišene ekspresije upalnih citokina koji imaju važnu ulogu za vrijeme crijevne upale i oštećenja tkiva u UBC-u. Nekoliko istraživanja na životinjskim modelima pokazala su da upalni procesi imaju utjecaj na ekspresiju i funkciju *MDR1* i *BCRP* [235, 236], što je također uočeno i kod ljudi [203, 226]. Opće je prihvaćeno da upalni proces može suprimirati ekspresiju i aktivnost nekoliko jetrenih transportera [237–239]. Naši rezultati ukazuju da se ekspresije proupalnih citokina razlikuju između CB-a i UK-a, odnosno između odraslih i djece oboljele od UBC-a i zdravih ispitanika.

Pronašli smo da ileum zahvaćen upalom u odraslih bolesnika s CB-om ne pokazuje očekivani citokinski profil s povišenom razinom *IFN- γ* u neliječenoj grupi (**Slika 13.**). Međutim, zapažena je povišena razina *IFN- γ* u liječenoj grupi te je moguće da je posljedica terapije sulfasalazinom koja može povisiti njegovu ekspresiju [240] ukazujući da se posebna pažnja mora obratiti u utvrđivanju uloge pojedinih medijatora u patogenezi bolesti ovisno o izboru ispitanika. Također, nismo pronašli razlike u ekspresijama *IL-6* i *IL-1 β* među definiranim grupama, iako je *IL-6* bio granično povišen u neličečnoj grupi odraslih bolesnika s CB-om ($P=0,0625$). Njihove povišene razine su već prethodno utvrđene u CB-u, a i terapija s anti-*IL-6* antitijelom postaje novi obećavajući način liječenja ove bolesti [241, 242]. Neočekivano, kod ispitanika pod terapijom uočili smo prolazno povišenje razine *IL-17A* u remisiji. *IL-17A* je povezan s patologijom UBC-a preko pojačavanja mehanizama urođene imunosti [92]. Reguliran je od strane *IL-23* koji je potreban i za indukciju *IL-22* kao još jednog citokina vezanog za Th17 tip imunosti. Nažalost, nismo mjerili ekspresiju *IL-22*, koji pokazuje zaštitnu ulogu u CB-u [243], s ciljem određivanja *IL-17A/IL-22* odnosa. Moguće je da se očititi manjak povišenih ekspresija ispitivanih citokina na upalnom tkivu odraslih

bolesnika s CB-om može objasniti prisutstvom povišene razine drugih proupalnih citokina koji nisu uključeni u istraživanje, posebice TNF- α , za kojeg se zna da je povišen u UBC-u i cilj uspješne anti-TNF- α terapije [244]. Manjak povišene razine *IL-1 β* i *IL-17A* u neliječeni bolesnika je u skladu s neučinkovitošću primjene specifičnih anti-citokinskih monoklonskih protutijela u CB-u [245, 246].

Za razliku od upalom zahvaćenog ileuma, pronašli smo povišene razine *IFN- γ* i *IL-2* na nezahvaćenom kolonu u nelijećenoj grupi odraslih s CB-om, koji su normalizirani na vrijednosti zdravih ispitanika u lijećenoj grupi, ali su zadržali povišenu razinu u remisiji (**Slika 13.**). Razina *IL-1 β* je također povišena u nelijećenoj grupi, ali se normalizira nakon smirivanja upalnog procesa. Ovi podaci ukazuju da je nezahvaćeni kolon odraslih bolesnika s CB-om karakteriziran citokinskim profilom limfocita Th1 tipa i povišenim ekspresijama urođenog citokina *IL-1 β* kao što je opisano u CB-u [247].

Za razliku od CB-a pronašli smo da je kolon zahvaćen upalom u odraslih bolesnika s UK-om karakteriziran povišenim razinama *IFN- γ* , *IL-17A* i *IL-6*, što je u skladu s objavljenim rezultatima istraživanja [213, 248, 249] i predstavlja „miješoviti“ citokinski profil limfocita Th1/Th17 tipa (**Slika 14.**). Zanimljivo je da nismo pronašli razlike u ekspresiji *IL-1 β* između definiranih grupa bolesnika i zdravih ispitanika. Od važnosti je pronalazak povišenih razina *IL-6*, *IL-1 β* i *IL-17A* na nezahvaćenom ileumu novodijagnosticiranih odraslih bolesnika s UK-om (**Slika 14.**), kao i povišenih razina *IFN- γ* , *IL-6* i *IL-1 β* na nezahvaćenom ileumu djece s aktivnim UK-om (**Slika 17.**) Ovi rezultati upućuju da se i zdravi dijelovi probavnog sustava bolesnika s UK-om ponašaju kao područja zahvaćena upalom. Jedan od mogućih mehanizama kojim djeluju ispitani citokini mogla bi biti indukcija ekspresije jednog glavnog citokina koji bi onda bio odgovoran za opaženo sniženje ekspresija transportera, kao što su predložili Stein i sur. [250].

Zapazili smo različitu ekspresiju ispitivanih citokina i molekula SOCS tijekom terapije odraslih bolesnika s UK-om. Primjerice, u Slučaju 1 praćenja tijeka bolesti razina citokina i molekula SOCS opada ulaskom u remisiju, što je najviše izraženo za *IL-6*, *IL-17A* i *SOCS1*, dok su u Slučaju 2 dobiveni suprotni rezultati, tj. najviše vrijednosti ekspresija citokina i molekula SOCS dobivene su u točki remisije i relapsa. Ovi podaci upućuju na to da povišene razine ispitivanih citokina u remisiji možda mogu služiti kao svojevrsni biljeg budućeg tijeka bolesti odnosno relapsa.

Suprotno odraslima, kod pedijatrijskih bolesnika smo pronašli povišene razine proupalnih citokina kod obje etiologije UBC-a. Tako upalno tkivo pedijatrijskih bolesnika s CB-om pokazuje povišene razine *IFN- γ* , *IL-6* i *IL-1 β* u neliječenoj grupi, dok se njihova razina snižava s uvođenjem terapije te je u remisiji blizu razina zdravih ispitanika (**Slika 16.**). Upaljeno tkivo pedijatrijskih bolesnika s UK-om karakterizirano je povišenim razinama *IFN- γ* , *IL-17A*, *IL-6* i *IL-1 β* za vrijeme aktivne upale, dok su u remisiji razine usporedive sa zdravim ispitanicima (**Slika 16.**). Ekspresije citokina u obje bolesti pozitivno su povezane s aktivnosti bolesti što potvrđuje upalu kao dominantni patološki mehanizam u upalnim bolestima crijeva. Ovi rezultati slažu se s istraživanjem koje pokazuje povišene vrijednosti *IFN- γ* i *IL-17A* u upalom zahvaćenom dijelu kolona bolesnika s UK-om, kao i povišene *IFN- γ* , *IL-17A* i *IL-6* u upaljenom tkivu ileuma kod CB-a [251]. Povišena razina citokina *IL-17A* se povezuje s patogeneza CB-a kod odraslih bolesnika [104, 252]. Međutim, mi nismo pronašli povišenu razinu *IL-17A* u upaljenom ileumu pedijatrijskih ispitanika (**Slika 16.**). Sukladno našim rezultatima, Hölttä i sur. [249] pronašli su povišene razine *IL-6* i *IL-17A* u sluznici kolona pedijatrijskih bolesnika s CB-om i UK-om, bez promjene u razini *IL-17A* u ileumu između grupa ispitanika i kontrola. Suprotno, *IL-2* ekspresija nije se razlikovala između zdravih kontrola i definiranih grupa oboljelih od CB-a, dok je bila značajno povišena u remisiji UK-a. Naši podatci pokazuju da je CB kod pedijatrijskih bolesnika karakteriziran citokinskim profilom limfocita Th1 tipa, a UK s miješovitim citokinskim profilom limfocita Th1/Th17 tipova. Obje bolesti također pokazuju povišene razine proupalnih citokina *IL-6* and *IL-1 β* . S obzirom da je citokin *IL-6* važan u Th1 i Th17 imunosnom odgovoru smatra se da igra ključnu ulogu za vrijeme akutne faze UBC-a [253, 254]. Važnost *IL-6* u UBC-u dokazana je u istraživanju gdje je izmjerena niska razina *IL-6* u histološki normalnim biopsijama ispitanika oboljelih od UBC-a, nasuprot povišenoj razini u lamini propriji novodijagnosticiranih ispitanika s UBC-om [64]. Također, povišena razina *IL-6* zapažena je u perifernoj krvi ispitanika s akutnim UBC-om u usporedbi s remisijom [255]. Važnost *IL-6*:STAT3 signalnog puta u UBC-u [256, 257] je dodatno potvrđena povišenom aktivnošću STAT3 i njegovih ciljnih gena [258, 259].

Na nezahvaćenom kolonu pedijatrijskih bolesnika s CB-om također smo pronašli povišene razine *IFN- γ* u svim trima grupama, kao i *IL-6*, *IL-1 β* i *IL-17A* za vrijeme aktivne upale čije se ekspresije normaliziraju na vrijednosti zdravih ispitanika u remisiji (**Slika 17.**). Također, pronašli smo i povišene razine *IFN- γ* , *IL-6* i *IL-1 β* na nezahvaćenom ileumu pedijatrijskih ispitanika s UK-om (**Slika 17.**). Ovi podatci, kao i oni u slučaju ileuma kod

odraslih ispitanika s UK-om, u skladu su s istraživanjem koja ukazuje na uključenost ileuma u UK-u [260]. Za razliku od naših rezultata, istraživanje koju su proveli Drastich i sur. [261] nije pokazalo povišenje IL-6 razine na upalom nezahvaćenom dijelu ileuma u ispitanika s UK-om. Nadalje, dodatna potvrda o postojanju aktivacije imunosti u ileumu ispitanika s UK-om proizlazi iz podataka o povišenim razinama *IFN- γ* i *IL-1 β* kod pedijatrijskih, kao i *IL-6*, *IL-1 β* i *IL-17A* kod odraslih, u neliječenoj i liječenoj grupi, koji padaju na razine kontrola u remisiji, baš kao i na upalnom području kolona.

Dakle, prema našim rezultatima, CB kod odraslih nije karakteriziran citokinskim profilom limfocita Th1 tipa, za razliku od djece. Točno objašnjenje za nedostatak tipičnog citokinskog profila limfocita u odraslih ispitanika s CB-om nije u potpunosti jasno. Prema nalazima kod djece s CB-om *IFN- γ* je prisutan te je upitno postoji li promjena citokinskog odgovora ovisno o vremenskom tijeku bolesti. To bi upućivalo da možda dolazi do promjene u citokinskom odgovoru te da možda drugi citokini preuzimaju glavnu ulogu u održavanju patogenetske slike kao što je slučaj za *TNF- α* koji je ujedno cilj uspješne terapije Infliksimabom i Adalimumabom u odraslih i bolesne djece. Za razliku od CB-a, UK je kod odraslih i djece karakteriziran miješovitim citokinskim profilom limfocita Th1/Th17 tipova, s izraženom povišenom razinom *IL-2* u remisiji, što bi moglo upućivati na važnost regulatornih limfocita T [262] bez obzira na dob u kojoj se bolest razvila.

Regulacija citokinske signalizacije je pod strogim nadzorom molekula SOCS što je nužno za ograničavanje prekomjernog upalnog odgovora [263]. Također, budući da molekule SOCS negativno reguliraju biološku aktivnost citokina, mogle bi imati važnu ulogu u kontroli oštećenja sluznice u UBC-u [133].

Naši rezultati pokazuju da na upaljenom tkivu odraslih s CB-om nema razlika u ekspresiji *SOCS1* među definiranim grupama (**Slika 13.**). *SOCS1* negativno regulira put posredovan molekulama STAT1 [134, 264, 265] te je nedostatak povišene razine *SOCS1* u novootkrivenih bolesnika sukladan s nepromjenjenim ekspresijama *IFN- γ* i *IL-1 β* . Međutim, *SOCS1* je negativni regulator i signalnog puta za *TNF- α* te izostanak povišene razine molekula *SOCS1* na upalnom dijelu ileuma CB-a može dodatno doprinijeti upali posredovanoj tim citokinom. Povišena razina *SOCS3* na upaljenom ileumu odraslih s CB-om prati kinetiku ekspresija *IFN- γ* i *IL-17A* (**Slika 13.**). Zanimljivo, pronašli smo povišene razine *SOCS1* i *SOCS3* na nezahvaćenom kolonu odraslih s CB-om koji su popraćeni povišenim ekspresijama *IFN- γ* , *IL-2* i *IL-1 β* (**slika 13**). Visoka ekspresija *SOCS1* i *SOCS3* na

nezahvaćenim područjima neliječene grupe može biti razlog tome što nezahvaćeni dijelovi ne pokazuju histološke promjene unatoč povišenim razinama proupalnih citokina.

Kod odraslih oboljelih od UK pronašli smo povišene razine *SOCS1* i *SOCS3* na dijelu kolona zahvaćenog upalom i na nezahvaćenom ileumu, koji su u skladu s povišenim ekspresijama *IFN- γ* , *IL-6*, *IL-1 β* i *IL-17A* (**Slika 14.**). Povišena razina *SOCS3* u remisiji pokazala se kao potencijalni biljeg relapse bolesti [266], što je u našem ispitivanju primijećeno u Slučaju 2 kod praćenja tijeka bolesti gdje su najviše vrijednosti ekspresija citokina i SOCS molekula dobivene u točki remisije i relapsa.

Slični rezultati pronađeni su i kod pedijatrijskih ispitanika oboljelih od CB-a i UK-a (**Slike 16.-17.**). Naime, iako je jačina ekspresije *IFN- γ* slična i kod pedijatrijskog CB-a i UK-a, samo je kod UK-a razina *SOCS1* značajno povišena. Izostanak povišene razine *SOCS1*, unatoč višim vrijednostima za *IFN- γ* , ukazuje na nedovoljnu negativnu regulaciju signalnog STAT1 puta i posljedičnog pogoršanja Th1-posredovane upale u bolesnika s CB-om. *IL-6* i *SOCS3* su usklađeno povišeni u tkivima s UBC-om. Povišena razina *SOCS3* je i prije pokazana u kolonu ispitanika oboljelih od CB-a i UK-a [130, 134, 136] i može biti rezultat visoke ekspresije *IL-6* i *IL-17* kao i povratne regulacije aktivacije STAT3 [130, 138, 267]. Iako su vrijednosti više nego kod zdravih ispitanika, razina *SOCS3* kod bolesnika s UK-om je značajno niža u usporedbi s CB-om unatoč visokim razinama *IL-6* i *IL-17A*. Niža razina *SOCS3* mogla bi doprinijeti nereguliranoj aktivaciji STAT3 puta i naknadnom pogoršanju IL-6/IL-17 pokrenute upale opažene kod pedijatrijskog UK-a [249]. Točna uloga *SOCS3* u UBC-u nije potpuno razjašnjena. Iako je povezan s održavanjem ravnoteže između zacijeljivanja rana sluznice i hiperplazije [268], *SOCS3* bi također mogao doprinijeti akutnoj crijevnoj upali pomoću povišene proizvodnje citokina TNF- α [269]. Nedavni unos *SOCS3* posredovan adenovirusima u zglobove životinja s artritismom doveo je do značajnog smanjenja znakova bolesti [270], što bi se moglo iskoristiti i kod UBC kao moguća nova terapija.

S obzirom na dobivene rezultate izmijenjenih ekspresija ABC transportera i citokina/molekula SOCS u upalnim bolestima crijeva, proveli smo statističku analizu korelacija (**Tablica 4.**). Kod odraslih bolesnika s CB-a nismo pronašli međuovisnosti ispitivanih molekula, dok su kod ispitanika s UK-om uočene pozitivne povezanosti za *MDR1* i *IL-6* odnosno *MRP1/IFN- γ* . Rezultati na pedijatrijskim bolesnicima pokazuju negativnu povezanost za *IFN- γ* , *IL-6* i *IL-1 β* naspram *MDR1* i *BCRP*, odnosno pozitivnu korelaciju za *MRP1* i *IFN- γ* te *IL-6*. Kod pedijatrijskog UK-a, uz *IFN- γ* , *IL-6* i *IL-1 β* , *MDR1* negativno

korelira i s ekspresijom *IL-17A*, suprotno od *MRP1*. Iako su ekspresije transportera korelirale s vrijednostima ekspresija citokina, pronašli smo jedino da je *MDR1* u pedijatrijskom UK-u pozitivno povezan s aktivnosti bolesti, što je i prije opisano [271]. Iz navedenih podataka proizlazi da je promijenjena ekspresija ABC transportera u UBC-u modulirana upalom i vjerojatno dodatnim čimbenicima. Pozitivna korelacija između *MRP1* i upalnih citokina mogla bi upućivati na njegovu zaštitnu ulogu u patogenezi UBC-a. Rezultati pokazuju da je *IL-6* povezan s nižom razinom *MDR1* kod UBC-a bez obzira na dob pri kojoj je bolest dijagnosticirana.

Ukupno, ovi rezultati ukazuju da se nezahvaćeno tkivo odraslih bolesnika i djece s CB-om i UK-om, razlikuje od zdravih ispitanika budući da su izmjerene povišene ekspresije citokina i molekula SOCS. Visoka razina *SOCS1* i *SOCS3* na nezahvaćenom tkivu novodijagnosticirane grupe mogla bi biti razlog zašto nezahvaćeni dijelovi ne pokazuju histološke promjene unatoč visokoj ekspresiji citokina, budući da *SOCS1* sudjeluje u negativnoj regulaciju *IFN- γ* signalizacije, dok *SOCS3* negativno regulira *IL-6/IL-17* signalni put [130, 133, 136, 138, 272]. Također, ovo je prema našem znanju prvo istraživanje koje pokazuje sniženje ekspresije *BCRP* i/ili *MDR1* te povišenu ekspresiju *MRP1* kod pedijatrijskih upalnih bolesti crijeva, koji koreliraju s ekspresijama upalnih citokina. Nadalje, citokinski profil limfocita Th1 u ileumu CB-a kod pedijatrijskih bolesnika kao i miješoviti citokinski profil limfocita Th1/Th17 na upaljenom tkivu odraslih i pedijatrijskih bolesnika oboljelih od UK-a mogli bi biti povezani s nedovoljnom ekspresijom *SOCS1* i *SOCS3*, kao i nereguliranim putevima *STAT1* i *STAT3* u patologiji UBC-a. Citokini i ABC transporteri imaju različite profile ekspresija u CB-u i UK-u koji se mijenjaju ovisno o stadiju bolesti. Uključenost *BCRP*-a u patogenezu CB-a, kao i *MRP1* u patogenezu UK-a kod pedijatrijskih bolesnika, kao i kod odraslih s CB-om je moguća, ali su potrebna dodatna istraživanja. Opažena snižena razina *MDR1* u tkivu bolesnika ukazuje na njegovu moguću ulogu u patogenezi UBC-a kroz određenu fiziološku ulogu, vjerojatno kroz modulaciju međureakcija s komenzalima [205], ali isto tako kroz modulaciju imunosne reakcije. Nasuprot tome, druga istraživanja isključuju ulogu transportera koji sudjeluju u izbacivanju lijeka u patogenezi UBC-a [273]. Očito je da su potrebna dodatna istraživanja koja bi pobliže otkrila stvarnu uključenost *MDR1* u patogenezi UBC-a.

Važno je za napomenuti da je ovo istraživanje provedeno samo na mRNA razini i obuhvaća heterogenu populaciju stanica te stoga predstavlja prosjek različitih populacija stanica. Za potpuniji uvid u povezanost ABC transportera s patogenezi upalnih bolesti

crijeva, kao i za jasniju sliku o promjenama njihovih ekspresija u različitim stadijima bolesti, trebalo bi analizirati i ekspresiju njihovih proteina što u ovom istraživanju tehnički nije bilo moguće.

7. ZAKLJUČAK

Ovo istraživanje imalo je dva glavna cilja i uključivalo je odrasle i pedijatrijske bolesnike oboljele od upalnih bolesti crijeva podijeljene u tri skupine: novodijagnosticirani/neliječeni, oboljeli pod terapijom/liječenii u remisiji, te odgovarajuće zdravi ispitanici. Prvo je određen profil ekspresija triju ABC transportera (*MDR1*, *MRP1*, *BCRP*) na terminalnom ileumu, duž kolona i rektumu; zatim, ekspresije *MDR1*, *MRP1* i *BCRP*, kao i ekspresije odabranih proupalnih citokina i njegovih negativnih regulatora, molekula SOCS, uspoređene su između grupa oboljelih i zdravih ispitanika, te je ispitana povezanost između razina ABC transportera i proupalnih citokina od interesa, kao i njihova povezanost s aktivnosti bolesti.

Rezultati su pokazali da je profil ekspresija ABC transportera duž ispitivanih lokacija probavnog sustava sličan između zdravih ispitanika i bolesnika s UBC-om bez obzira na dob. Međutim, u usporedbi s dobno podudarnim zdravim kontrolama, i pedijatrijski i odrasli ispitanici oboljeli od UBC-a imali su snižene razine *MDR1* bez obzira na stadij bolesti, sniženu razinu *BCRP*-a za vrijeme aktivne upale, te sniženu razinu *MRP1* kod odraslih bolesnika s CB-om, odnosno povišenu razinu *MRP1* kod pedijatrijskih bolesnika s UK-om. Ekspresija proupalnih citokina, kao i molekula SOCS, povišena je u odraslih i pedijatrijskih bolesnika s UBC-a u odnosu na zdrave ispitanika što potvrđuje upalni proces kao dominantni patološki mehanizam u upalnim bolestima crijeva. Uključenost *BCRP*- u patogenezu CB-a, kao i *MRP1* u patogenezu UK-a kod djece, kao i kod odraslih s CB-om je moguća, ali su potrebna dodatna istraživanja. Ovo istraživanje po prvi puta pokazuje izmjenjene ekspresije *MDR1*, *MRP1* i *BCRP* kod bolesne djece koji koreliraju s povišenim razinama citokina te ukazuje na moguće različite uloge ovih transportera u ranoj nasuprot kasnoj patogenezi upalnih bolesti crijeva. Ekspresija ispitanih ABC transportera, citokina i molekula SOCS nije konstantna već je podložna promjenama ovisno o stadiju bolesti. Prema tome, promjene u njihovim ekspresijama mogle bi imati funkcionalnu važnost u progresiji bolesti i izboru liječenja.

8. LITERATURA

1. Dietrich, CG, A Geier, and RPJ Oude Elferink. 2003. ABC of Oral Bioavailability: Transporters as Gatekeepers in the Gut. *Gut* 52: 1788–95.
2. Chan, Lauretta M S, Simon Lowes, and Barry H Hirst. 2004. The ABCs of Drug Transport in Intestine and Liver: Efflux Proteins Limiting Drug Absorption and Bioavailability. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 21 (1): 25–51
3. Sarkadi, Balázs, László Homolya, Gergely Szakács, and András Váradi. 2006. Human Multidrug Resistance ABCB and ABCG Transporters: Participation in a Chemoimmunity Defense System. *Physiological Reviews* 86 (4): 1179–1236.
4. Zimmermann, Christian, Heike Gutmann, Petr Hruz, Jean-Pierre Gutzwiller, Christoph Beglinger, Juergen Drewe, and Juergen Drewe Christian Zimmermann, Heike Gutmann, Petr Hruz, Jean-Pierre Gutzwiller, Christoph Beglinger. 2005. Mapping of Multidrug Resistance Gene 1 and Multidrug Resistance-Associated Protein Isoform 1 to 5 mRNA Expression along the Human Intestinal Tract. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals* 33 (2): 219–24.
5. Annese, V, M-R Valvano, O Palmieri, a Latiano, F Bossa, and a Andriulli. 2006. Multidrug Resistance 1 Gene in Inflammatory Bowel Disease: A Meta-Analysis. *World Journal of Gastroenterology* 12 (23): 3636–44.
6. Langman et al. 2004. Loss of Detoxification in Inflammatory Bowel Disease: Dysregulation of Pregnane X Receptor Target Genes. *Gastroenterology* 127: 26–40.
7. Ho, G-T, F M Moodie, and J Satsangi. 2003. Multidrug Resistance 1 Gene (P-Glycoprotein 170): An Important Determinant in Gastrointestinal Disease? *Gut* 52 (5): 759–66.
8. Baugmart DC (2012) Crohn's Disease and Ulcerative Colitis. From Epidemiology and Immunobiology to a Rational Diagnostic and Therapeutic Approach, Springer US.
9. Price, A B. 1978. Overlap in the Spectrum of Non-Specific Inflammatory Bowel Disease--'Colitis Indeterminate'. *Journal of Clinical Pathology* 31 (6): 567–77.
10. Wells, A D, I McMillan, A B Price, J K Ritchie, and R J Nicholls. 1991. Natural History of Indeterminate Colitis. *The British Journal of Surgery* 78 (2): 179–81.
11. Kucharzik, Torsten, Christian Maaser, Andreas Lügering, Martin Kagnoff, Lloyd Mayer, Stephan Targan, and Wolfram Domschke. 2006. Recent Understanding of IBD Pathogenesis: Implications for Future Therapies. *Inflammatory Bowel Diseases* 12 (11): 1068–83.
12. Xavier, R J, and D K Podolsky. 2007. Unravelling the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease. *Nature* 448 (7152): 427–34.

13. Sartor, R Balfour. 2006. Mechanisms of Disease: Pathogenesis of Crohn's Disease and Ulcerative Colitis. *Nature Clinical Practice. Gastroenterology & Hepatology* 3 (7): 390–407.
14. Rogler, G, and T Andus. 1998. Cytokines in Inflammatory Bowel Disease. *World Journal of Surgery* 22 (4): 382–89.
15. Papadakis, Konstantinos A. 2004. Chemokines in Inflammatory Bowel Disease. *Current Allergy and Asthma Reports* 4 (1): 83–89.
16. Podolsky, Daniel K. 2002. The Current Future Understanding of Inflammatory Bowel Disease. *Best Practice & Research. Clinical Gastroenterology* 16 (6): 933–43.
17. Crohn, Burrill B. 1932. Regional ileitis: a pathologic and clinical entity. *JAMA: The Journal of the American Medical Association* 99 (16): 1323.
18. Yantiss, R K, and R D Odze. 2006. Diagnostic Difficulties in Inflammatory Bowel Disease Pathology. *Histopathology* 48 (2): 116–32.
19. Hanauer, Stephen B. 2006. Inflammatory Bowel Disease: Epidemiology, Pathogenesis, and Therapeutic Opportunities. *Inflammatory Bowel Diseases* 12 Suppl 1 (January): S3–9.
20. Loftus, Edward V. 2004. Clinical Epidemiology of Inflammatory Bowel Disease: Incidence, Prevalence, and Environmental Influences. *Gastroenterology* 126 (6): 1504–17.
21. Vucelić, B, B Korać, M Sentić, D Milicić, N Hadzić, V Juresa, J Bozikov, I Rotkvić, M Buljevac, and I Kovacević. 1991a. Epidemiology of Crohn's Disease in Zagreb, Yugoslavia: A Ten-Year Prospective Study. *International Journal of Epidemiology* 20 (1): 216–20.
22. Vucelić, B, B Korać, M Sentić, D Milicić, N Hadzić, V Juresa, J Bozikov, I Rotkvić, M Buljevac, and I Kovacević. 1991b. Ulcerative Colitis in Zagreb, Yugoslavia: Incidence and Prevalence 1980-1989. *International Journal of Epidemiology* 20 (4): 1043–47.
23. Frangos, Constantinos C, and Christos C Frangos. 2007. Inflammatory Bowel Disease: Reviewing an Old Study under a New Perspective. *Gut* 56 (11): 1638–39.
24. Lindberg, E, C Tysk, K Andersson, and G Järnerot. 1988. Smoking and Inflammatory Bowel Disease. A Case Control Study. *Gut* 29 (3): 352–57.
25. Russel, M G, F H Nieman, J M Bergers, and R W Stockbrügger. 1996. Cigarette Smoking and Quality of Life in Patients with Inflammatory Bowel Disease. *South Limburg IBD Study Group. European Journal of Gastroenterology & Hepatology* 8 (11): 1075–81.

26. Thomas, G A, J Rhodes, V Mani, G T Williams, R G Newcombe, M A Russell, and C Feyerabend. 1995. Transdermal Nicotine as Maintenance Therapy for Ulcerative Colitis. *The New England Journal of Medicine* 332 (15): 988–92.
27. Guslandi, M. 1999. Nicotine Treatment for Ulcerative Colitis. *British Journal of Clinical Pharmacology* 48 (4): 481–84.
28. Wakefield, A J, R M Pittilo, R Sim, S L Cosby, J R Stephenson, A P Dhillon, and R E Pounder. 1993. Evidence of Persistent Measles Virus Infection in Crohn's Disease. *Journal of Medical Virology* 39 (4): 345–53.
29. Pardi, D S, W J Tremaine, W J Sandborn, E V Loftus, G A Poland, W S Harmsen, A R Zinsmeister, and L J Melton. 2000. Early Measles Virus Infection Is Associated with the Development of Inflammatory Bowel Disease. *The American Journal of Gastroenterology* 95 (6): 1480–85.
30. Al-Shamali, M, I Khan, B Al-Nakib, F Al-Hassan, and A S Mustafa. 1997. A Multiplex Polymerase Chain Reaction Assay for the Detection of Mycobacterium Paratuberculosis DNA in Crohn's Disease Tissue. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 32 (8): 819–23.
31. Burke, D A, and A T Axon. 1987. Ulcerative Colitis and Escherichia Coli with Adhesive Properties. *Journal of Clinical Pathology* 40 (7): 782–86.
32. Podolsky, D K. 1999. Mucosal Immunity and Inflammation. V. Innate Mechanisms of Mucosal Defense and Repair: The Best Offense Is a Good Defense. *The American Journal of Physiology* 277 (3 Pt 1): G495–99.
33. Sartor, R B. 1997. Pathogenesis and Immune Mechanisms of Chronic Inflammatory Bowel Diseases. *The American Journal of Gastroenterology* 92 (12 Suppl): 5S – 11S.
34. Sanchez-Munoz, Fausto, Aaron Dominguez-Lopez, Jesus-K Yamamoto-Furusho, and Fausto Sanchez-Muñoz. 2008. Role of Cytokines in Inflammatory Bowel Disease. *World Journal of Gastroenterology* 14 (27): 4280.
35. Goubier, Anne, Bertrand Dubois, Hanane Gheit, Grégoire Joubert, Florence Villard-Truc, Carine Asselin-Paturel, Giorgio Trinchieri, and Dominique Kaiserlian. 2008. Plasmacytoid Dendritic Cells Mediate Oral Tolerance. *Immunity* 29 (3): 464–75.
36. Breese, E, C P Braegger, C J Corrigan, J A Walker-Smith, and T T MacDonald. 1993. Interleukin-2- and Interferon-Gamma-Secreting T Cells in Normal and Diseased Human Intestinal Mucosa. *Immunology* 78 (1): 127–31.
37. Monteleone, G, L Biancone, R Marasco, G Morrone, O Marasco, F Luzzza, and F Pallone. 1997. Interleukin 12 Is Expressed and Actively Released by Crohn's Disease Intestinal Lamina Propria Mononuclear Cells. *Gastroenterology* 112 (4): 1169–78.
38. Fais, S, M R Capobianchi, F Pallone, P Di Marco, M Boirivant, F Dianzani, and A Torsoli. 1991. Spontaneous Release of Interferon Gamma by Intestinal Lamina Propria

- Lymphocytes in Crohn's Disease. Kinetics of in Vitro Response to Interferon Gamma Inducers. *Gut* 32 (4): 403–7.
39. Autschbach, Frank, Thomas Giese, Nikolaus Gassler, Bernd Sido, Gundi Heuschen, Udo Heuschen, Ivan Zuna, et al. 2002. Cytokine/chemokine Messenger-RNA Expression Profiles in Ulcerative Colitis and Crohn's Disease. *Virchows Archiv : An International Journal of Pathology* 441 (5): 500–513.
 40. Leon, Francisco, Lesley E Smythies, Phillip D Smith, and Brian L Kelsall. 2006. Involvement of Dendritic Cells in the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 579 (January): 117–32.
 41. MacDermott, R P, G S Nash, M J Bertovich, M V Seiden, M J Bragdon, and M G Beale. 1981. Alterations of IgM, IgG, and IgA Synthesis and Secretion by Peripheral Blood and Intestinal Mononuclear Cells from Patients with Ulcerative Colitis and Crohn's Disease. *Gastroenterology* 81 (5): 844–52.
 42. Saxon, A, F Shanahan, C Landers, T Ganz, and S Targan. 1990. A Distinct Subset of Antineutrophil Cytoplasmic Antibodies Is Associated with Inflammatory Bowel Disease. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* 86 (2): 202–10.
 43. Das, K M, A Dasgupta, A Mandal, and X Geng. 1993. Autoimmunity to Cytoskeletal Protein Tropomyosin. A Clue to the Pathogenetic Mechanism for Ulcerative Colitis. *Journal of Immunology* 150 (6): 2487–93.
 44. Takahasi, F, H S Shah, L S Wise, and K M Das. 1990. Circulating Antibodies against Human Colonic Extract Enriched with a 40 kDa Protein in Patients with Ulcerative Colitis. *Gut* 31 (9): 1016–20.
 45. Tysk, C, E Lindberg, G Järnerot, and B Flodérus-Myrhed. 1988. Ulcerative Colitis and Crohn's Disease in an Unselected Population of Monozygotic and Dizygotic Twins. A Study of Heritability and the Influence of Smoking. *Gut* 29 (7): 990–96.
 46. Thompson, N P, R Driscoll, R E Pounder, and A J Wakefield. 1996. Genetics versus Environment in Inflammatory Bowel Disease: Results of a British Twin Study. *BMJ (Clinical Research Ed.)* 312 (7023): 95–96.
 47. Sartor, R. B. 1991. Pathogenetic and Clinical Relevance of Cytokines in Inflammatory Bowel Disease. *Immunologic Research* 10 (3-4): 465–71.
 48. Yasukawa, H, H Misawa, H Sakamoto, M Masuhara, A Sasaki, T Wakioka, S Ohtsuka, et al. 1999. The JAK-Binding Protein JAB Inhibits Janus Tyrosine Kinase Activity through Binding in the Activation Loop. *The EMBO Journal* 18 (5): 1309–20.
 49. Yoshimura, Akihiko, Tetsuji Naka, and Masato Kubo. 2007. SOCS Proteins, Cytokine Signalling and Immune Regulation. *Nature Reviews. Immunology* 7 (6): 454–65.
 50. Tamiya, Taiga, Ikko Kashiwagi, Reiko Takahashi, Hideo Yasukawa, and Akihiko Yoshimura. 2011. Suppressors of Cytokine Signaling (SOCS) Proteins and JAK/STAT

- Pathways: Regulation of T-Cell Inflammation by SOCS1 and SOCS3. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 31 (5): 980–85.
51. Masuhara, M, H Sakamoto, A Matsumoto, R Suzuki, H Yasukawa, K Mitsui, T Wakioka, et al. 1997. Cloning and Characterization of Novel CIS Family Genes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 239 (2): 439–46.
 52. Liu, F, J Poursine-Laurent, H Y Wu, and D C Link. 1997. Interleukin-6 and the Granulocyte Colony-Stimulating Factor Receptor Are Major Independent Regulators of Granulopoiesis in Vivo but Are Not Required for Lineage Commitment or Terminal Differentiation. *Blood* 90 (7): 2583–90.
 53. Bettelli, Estelle, Yijun Carrier, Wenda Gao, Thomas Korn, Terry B Strom, Mohamed Oukka, Howard L Weiner, and Vijay K Kuchroo. 2006. Reciprocal Developmental Pathways for the Generation of Pathogenic Effector TH17 and Regulatory T Cells. *Nature* 441 (7090): 235–38.
 54. Pfliegerl, Pamina, Paul Vesely, Brigitte Hantusch, Michaela Schleder, Rainer Zenz, Elke Janig, Günter Steiner, et al. 2009. Epidermal Loss of JunB Leads to a SLE Phenotype due to Hyper IL-6 Signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106 (48): 20423–28.
 55. Reinecker, H C, M Steffen, T Witthoeft, I Pflueger, S Schreiber, R P MacDermott, and A Raedler. 1993. Enhanced Secretion of Tumour Necrosis Factor-Alpha, IL-6, and IL-1 Beta by Isolated Lamina Propria Mononuclear Cells from Patients with Ulcerative Colitis and Crohn's Disease. *Clinical and Experimental Immunology* 94 (1): 174–81.
 56. Croker, BA, H Kiu, M Pellegrini, and J Toe. 2011. IL-6 Promotes Acute and Chronic Inflammatory Disease in the Absence of SOCS3. *Immunology and Cell* 90: 124–29.
 57. Holub, M C, E Makó, T Dévay, M Dank, C Szalai, A Fenyvesi, and A Falus. 1998. Increased Interleukin-6 Levels, Interleukin-6 Receptor and gp130 Expression in Peripheral Lymphocytes of Patients with Inflammatory Bowel Disease. *Scandinavian Journal of Gastroenterology. Supplement* 228 (January): 47–50.
 58. Hyams, J S, J E Fitzgerald, W R Treem, N Wyzga, and D L Kreutzer. 1993. Relationship of Functional and Antigenic Interleukin 6 to Disease Activity in Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology* 104 (5): 1285–92.
 59. Gross, V, T Andus, I Caesar, M Roth, and J Schölmerich. 1992. Evidence for Continuous Stimulation of Interleukin-6 Production in Crohn's Disease. *Gastroenterology* 102 (2): 514–19.
 60. Reinisch, W, C Gasché, W Tillinger, J Wyatt, C Lichtenberger, M Willheim, C Dejaco, et al. 1999. Clinical Relevance of Serum Interleukin-6 in Crohn's Disease: Single Point Measurements, Therapy Monitoring, and Prediction of Clinical Relapse. *The American Journal of Gastroenterology* 94 (8): 2156–64.

61. Isaacs, K L, R B Sartor, and S Haskill. 1992. Cytokine Messenger RNA Profiles in Inflammatory Bowel Disease Mucosa Detected by Polymerase Chain Reaction Amplification. *Gastroenterology* 103 (5): 1587–95.
62. Brown, Kurt A, Susan J Back, Eduardo D Ruchelli, Jonathan Markowitz, Maria Mascarenhas, Ritu Verma, David A Piccoli, and Robert N Baldassano. 2002. Lamina Propria and Circulating Interleukin-6 in Newly Diagnosed Pediatric Inflammatory Bowel Disease Patients. *The American Journal of Gastroenterology* 97 (10): 2603–8.
63. Reimund, J M, C Wittersheim, S Dumont, C D Muller, J S Kenney, R Baumann, P Poindron, and B Duclos. 1996. Increased Production of Tumour Necrosis Factor-Alpha Interleukin-1 Beta, and Interleukin-6 by Morphologically Normal Intestinal Biopsies from Patients with Crohn's Disease. *Gut* 39 (5): 684–89.
64. Mudter, Jonas, and Markus F Neurath. 2007. Il-6 Signaling in Inflammatory Bowel Disease: Pathophysiological Role and Clinical Relevance. *Inflammatory Bowel Diseases* 13 (8): 1016–23.
65. Kai, Yasuyuki, Ichiro Takahashi, Hiromichi Ishikawa, Takachika Hiroi, Tsunekazu Mizushima, Chu Matsuda, Daisuke Kishi, et al. 2005. Colitis in Mice Lacking the Common Cytokine Receptor Gamma Chain Is Mediated by IL-6-Producing CD4+ T Cells. *Gastroenterology* 128 (4): 922–34.
66. Farrar, M A, and R D Schreiber. 1993. The Molecular Cell Biology of Interferon-Gamma and Its Receptor. *Annual Review of Immunology* 11 (January): 571–611.
67. Madara, J L, and J Stafford. 1989. Interferon-Gamma Directly Affects Barrier Function of Cultured Intestinal Epithelial Monolayers. *The Journal of Clinical Investigation* 83 (2): 724–27.
68. Iwasaki, Akiko, and Ruslan Medzhitov. 2010. Regulation of Adaptive Immunity by the Innate Immune System. *Science* 327 (5963): 291–95.
69. Raetz, Megan, Sun-Hee Hwang, Cara L Wilhelm, Donna Kirkland, Alicia Benson, Carolyn R Sturge, Julie Mirpuri, et al. 2013. Parasite-Induced T(H)1 Cells and Intestinal Dysbiosis Cooperate in IFN- γ -Dependent Elimination of Paneth Cells. *Nature Immunology* 14 (2): 136–42.
70. Melgar, Silvia, Agneta Karlsson, and Erik Michaëlsson. 2005. Acute Colitis Induced by Dextran Sulfate Sodium Progresses to Chronicity in C57BL/6 but Not in BALB/c Mice: Correlation between Symptoms and Inflammation. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* 288 (6): G1328–38.
71. Ito, R, M Shin-Ya, T Kishida, A Urano, R Takada, J Sakagami, J Imanishi, et al. 2006. Interferon-Gamma Is Causatively Involved in Experimental Inflammatory Bowel Disease in Mice. *Clinical and Experimental Immunology* 146 (2): 330–38.
72. Bamias, Giorgos, Charles Martin, Marco Marini, Sharon Hoang, Margarita Mishina, William G Ross, Muhammadreza A Sachedina, et al. 2003. Expression, Localization,

- and Functional Activity of TL1A, a Novel Th1-Polarizing Cytokine in Inflammatory Bowel Disease. *Journal of Immunology* 171 (9): 4868–74.
73. MacDonald, T T, M Bajaj-Elliott, and S L Pender. 1999. T Cells Orchestrate Intestinal Mucosal Shape and Integrity. *Immunology Today* 20 (11): 505–10.
 74. Ligumsky, M, P L Simon, F Karmeli, and D Rachmilewitz. 1990. Role of Interleukin 1 in Inflammatory Bowel Disease--Enhanced Production during Active Disease. *Gut* 31 (6): 686–89.
 75. McCabe, R P, H Secrist, M Botney, M Egan, and M G Peters. 1993. Cytokine mRNA Expression in Intestine from Normal and Inflammatory Bowel Disease Patients. *Clinical Immunology and Immunopathology* 66 (1): 52–58.
 76. Cappello, M, S Keshav, C Prince, D P Jewell, and S Gordon. 1992. Detection of mRNAs for Macrophage Products in Inflammatory Bowel Disease by in Situ Hybridisation. *Gut* 33 (9): 1214–19.
 77. McAlindon, M E, C J Hawkey, and Y R Mahida. 1998. Expression of Interleukin 1 Beta and Interleukin 1 Beta Converting Enzyme by Intestinal Macrophages in Health and Inflammatory Bowel Disease. *Gut* 42 (2): 214–19.
 78. Casini-Raggi, V, L Kam, YJ Chong, C Fiocchi, TT Pizarro, and F Cominelli. 1995. Mucosal Imbalance of IL-1 and IL-1 Receptor Antagonist in Inflammatory Bowel Disease. A Novel Mechanism of Chronic Intestinal Inflammation. *J. Immunol.* 154 (5): 2434–40.
 79. Dionne, S, I D D'Agata, J Hiscott, T Vanounou, and E G Seidman. 1998. Colonic Explant Production of IL-1 and Its Receptor Antagonist Is Imbalanced in Inflammatory Bowel Disease (IBD). *Clinical and Experimental Immunology* 112 (3): 435–42.
 80. Ashwood, P, R Harvey, T Verjee, R Wolstencroft, R P H Thompson, and J J Powell. 2004. Functional Interactions between Mucosal IL-1, IL-1Ra and TGF-Beta 1 in Ulcerative Colitis. *Inflamm Res.* 53 (2): 53–59.
 81. Sutton, Caroline, Corinna Brereton, Brian Keogh, Kingston H G Mills, and Ed C Lavelle. 2006. A Crucial Role for Interleukin (IL)-1 in the Induction of IL-17-Producing T Cells That Mediate Autoimmune Encephalomyelitis. *The Journal of Experimental Medicine* 203 (7): 1685–91.
 82. Chung, Yeonseok, Seon Hee Chang, Gustavo J Martinez, Xuexian O Yang, Roza Nurieva, Hong Soon Kang, Li Ma, et al. 2009. Critical Regulation of Early Th17 Cell Differentiation by Interleukin-1 Signaling. *Immunity* 30 (4): 576–87.
 83. Sutton, Caroline E, Stephen J Lalor, Cheryl M Sweeney, Corinna F Brereton, Ed C Lavelle, and Kingston H G Mills. 2009. Interleukin-1 and IL-23 Induce Innate IL-17 Production from Gammadelta T Cells, Amplifying Th17 Responses and Autoimmunity. *Immunity* 31 (2). Elsevier Ltd: 331–41.

84. Coccia, Margherita, Oliver J Harrison, Chris Schiering, Mark J Asquith, Burkhard Becher, Fiona Powrie, and Kevin J Maloy. 2012. IL-1 β Mediates Chronic Intestinal Inflammation by Promoting the Accumulation of IL-17A Secreting Innate Lymphoid Cells and CD4(+) Th17 Cells. *The Journal of Experimental Medicine* 209 (9): 1595–1609.
85. Shen, Wei, and Scott K Durum. 2010. Synergy of IL-23 and Th17 Cytokines: New Light on Inflammatory Bowel Disease. *Neurochemical Research* 35 (6): 940–46.
86. Mangan, Paul R, Laurie E Harrington, Darrell B O’Quinn, Whitney S Helms, Daniel C Bullard, Charles O Elson, Robin D Hatton, Sharon M Wahl, Trenton R Schoeb, and Casey T Weaver. 2006. Transforming Growth Factor-Beta Induces Development of the T(H)17 Lineage. *Nature* 441 (7090): 231–34.
87. Zou, Gang M, and Ying K Tam. Cytokines in the Generation and Maturation of Dendritic Cells: Recent Advances. *European Cytokine Network* 13 (2): 186–99.
88. Fossiez, F, O Djossou, P Chomarat, L Flores-Romo, S Ait-Yahia, C Maat, J J Pin, et al. 1996. T Cell Interleukin-17 Induces Stromal Cells to Produce Proinflammatory and Hematopoietic Cytokines. *The Journal of Experimental Medicine* 183 (6): 2593–2603.
89. Chabaud, M, F Fossiez, J L Taupin, and P Miossec. 1998. Enhancing Effect of IL-17 on IL-1-Induced IL-6 and Leukemia Inhibitory Factor Production by Rheumatoid Arthritis Synoviocytes and Its Regulation by Th2 Cytokines. *Journal of Immunology* 161 (1): 409–14.
90. Cai, X Y, C P Gommoll, L Justice, S K Narula, and J S Fine. 1998. Regulation of Granulocyte Colony-Stimulating Factor Gene Expression by Interleukin-17. *Immunology Letters* 62 (1): 51–58.
91. Jovanovic, D V, J A Di Battista, J Martel-Pelletier, F C Jolicoeur, Y He, M Zhang, F Mineau, and J P Pelletier. 1998. IL-17 Stimulates the Production and Expression of Proinflammatory Cytokines, IL-Beta and TNF-Alpha, by Human Macrophages. *Journal of Immunology* 160 (7): 3513–21.
92. Albanesi, C, A Cavani, and G Girolomoni. 1999. IL-17 Is Produced by Nickel-Specific T Lymphocytes and Regulates ICAM-1 Expression and Chemokine Production in Human Keratinocytes: Synergistic or Antagonist Effects with IFN-Gamma and TNF-Alpha. *Journal of Immunology* 162 (1): 494–502.
93. Katz, Y, O Nadiv, and Y Beer. 2001. Interleukin-17 Enhances Tumor Necrosis Factor Alpha-Induced Synthesis of Interleukins 1,6, and 8 in Skin and Synovial Fibroblasts: A Possible Role as a ‘Fine-Tuning Cytokine’ in Inflammation Processes. *Arthritis and Rheumatism* 44 (9): 2176–84.
94. LeGrand, A, B Fermor, C Fink, D S Pisetsky, J B Weinberg, T P Vail, and F Guilak. 2001. Interleukin-1, Tumor Necrosis Factor Alpha, and Interleukin-17 Synergistically up-Regulate Nitric Oxide and Prostaglandin E2 Production in Explants of Human Osteoarthritic Knee Menisci. *Arthritis and Rheumatism* 44 (9): 2078–83.

95. Matusevicius, D, P Kivisäkk, B He, N Kostulas, V Ozenci, S Fredrikson, and H Link. 1999. Interleukin-17 mRNA Expression in Blood and CSF Mononuclear Cells Is Augmented in Multiple Sclerosis. *Multiple Sclerosis* 5 (2): 101–4.
96. Chabaud, Martine, Erik Lubberts, Leo Joosten, Wim van den Berg, and Pierre Miossec. 2001. IL-17 Derived from Juxta-Articular Bone and Synovium Contributes to Joint Degradation in Rheumatoid Arthritis. *Arthritis Res* 3 (3): 1–10.
97. Kurasawa, K, K Hirose, H Sano, H Endo, H Shinkai, Y Nawata, K Takabayashi, and I Iwamoto. 2000. Increased Interleukin-17 Production in Patients with Systemic Sclerosis. *Arthritis and Rheumatism* 43 (11): 2455–63.
98. Wong, C K, C Y Ho, E K Li, and C W Lam. 2000. Elevation of Proinflammatory Cytokine (IL-18, IL-17, IL-12) and Th2 Cytokine (IL-4) Concentrations in Patients with Systemic Lupus Erythematosus. *Lupus* 9 (8): 589–93.
99. Lindén, A. 2001. Role of Interleukin-17 and the Neutrophil in Asthma. *International Archives of Allergy and Immunology* 126 (3): 179–84.
100. Ito, Reiko, Masakazu Kita, Masaharu Shin-Ya, Tsunao Kishida, Atsuyo Urano, Ryusuke Takada, Junichi Sakagami, et al. 2008. Involvement of IL-17A in the Pathogenesis of DSS-Induced Colitis in Mice. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 377 (1): 12–16.
101. Zhang, Zili, Mingquan Zheng, Julie Bindas, Paul Schwarzenberger, and Jay K Kolls. 2006. Critical Role of IL-17 Receptor Signaling in Acute TNBS-Induced Colitis. *Inflammatory Bowel Diseases* 12 (5): 382–88.
102. O'Connor, William, Masahito Kamanaka, Carmen J Booth, Terrence Town, Susumu Nakae, Yoichiro Iwakura, Jay K Kolls, and Richard A Flavell. 2009. A Protective Function for Interleukin 17A in T Cell-Mediated Intestinal Inflammation. *Nature Immunology* 10 (6): 603–9.
103. Fujino, S, A Andoh, S Bamba, A Ogawa, K Hata, Y Araki, T Bamba, and Y Fujiyama. 2003. Increased Expression of Interleukin 17 in Inflammatory Bowel Disease. *Gut* 52 (1): 65–70.
104. Annunziato, Francesco, Lorenzo Cosmi, Veronica Santarlasci, Laura Maggi, Francesco Liotta, Benedetta Mazzinghi, Eliana Parente, et al. 2007. Phenotypic and Functional Features of Human Th17 Cells. *The Journal of Experimental Medicine* 204 (8): 1849–61.
105. Seiderer, Julia, Ira Elben, Julia Diegelmann, Jürgen Glas, Johannes Stallhofer, Cornelia Tillack, Simone Pfennig, et al. 2008. Role of the Novel Th17 Cytokine IL-17F in Inflammatory Bowel Disease (IBD): Upregulated Colonic IL-17F Expression in Active Crohn's Disease and Analysis of the IL17F p.His161Arg Polymorphism in IBD. *Inflammatory Bowel Diseases* 14 (4): 437–45.
106. Brand, Stephan, Florian Beigel, Torsten Olszak, Kathrin Zitzmann, Sören T Eichhorst, Jan-Michel Otte, Helmut Diepolder, et al. 2006. IL-22 Is Increased in Active Crohn's

- Disease and Promotes Proinflammatory Gene Expression and Intestinal Epithelial Cell Migration. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* 290 (4): G827–38.
107. Dambacher, J, F Beigel, K Zitzmann, E N De Toni, B Göke, H M Diepolder, C J Auernhammer, and S Brand. 2009. The Role of the Novel Th17 Cytokine IL-26 in Intestinal Inflammation. *Gut* 58 (9): 1207–17.
 108. Sakuraba, Atsushi, Toshiro Sato, Nobuhiko Kamada, Mina Kitazume, Akira Sugita, and Toshifumi Hibi. 2009. Th1/Th17 Immune Response Is Induced by Mesenteric Lymph Node Dendritic Cells in Crohn's Disease. *Gastroenterology* 137 (5): 1736–45.
 109. Smith, K A. 1988. Interleukin-2: Inception, Impact, and Implications. *Science* 240 (4856): 1169–76.
 110. Cheng, Laurence E, Claes Ohlén, Brad H Nelson, and Philip D Greenberg. 2002. Enhanced Signaling through the IL-2 Receptor in CD8+ T Cells Regulated by Antigen Recognition Results in Preferential Proliferation and Expansion of Responding CD8+ T Cells rather than Promotion of Cell Death. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (5): 3001–6.
 111. Granucci, F, C Vizzardelli, N Pavelka, S Feau, M Persico, E Virzi, M Rescigno, G Moro, and P Ricciardi-Castagnoli. 2001. Inducible IL-2 Production by Dendritic Cells Revealed by Global Gene Expression Analysis. *Nature Immunology* 2 (9): 882–88. 82.
 112. Yang-Snyder, J A, and E V Rothenberg. 1998. Spontaneous Expression of Interleukin-2 in Vivo in Specific Tissues of Young Mice. *Developmental Immunology* 5 (4): 223–45.
 113. Bassiri, H, and S R Carding. 2001. A Requirement for IL-2/IL-2 Receptor Signaling in Intrathymic Negative Selection. *Journal of Immunology* 166 (10): 5945–54.
 114. Liao, Wei, Dustin E Schones, Jangsuk Oh, Yongzhi Cui, Kairong Cui, Tae-Young Roh, Keji Zhao, and Warren J Leonard. 2008. Priming for T Helper Type 2 Differentiation by Interleukin 2-Mediated Induction of Interleukin 4 Receptor Alpha-Chain Expression. *Nature Immunology* 9 (11): 1288–96.
 115. Liao, Wei, Jian-Xin Lin, Lu Wang, Peng Li, and Warren J Leonard. 2011. Modulation of Cytokine Receptors by IL-2 Broadly Regulates Differentiation into Helper T Cell Lineages. *Nature Immunology* 12 (6): 551–59.
 116. Liao, Wei, Jian-Xin Lin, and Warren J Leonard. 2011. IL-2 Family Cytokines: New Insights into the Complex Roles of IL-2 as a Broad Regulator of T Helper Cell Differentiation. *Current Opinion in Immunology* 23 (5): 598–604.
 117. Kusugami, K, T Matsuura, G A West, K R Youngman, D Rachmilewitz, and C Fiocchi. 1991. Loss of Interleukin-2-Producing Intestinal CD4+ T Cells in Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology* 101 (6): 1594–1605.

118. Ebert, E C, S H Wright, W H Lipshutz, and S P Hauptman. 1984. T-Cell Abnormalities in Inflammatory Bowel Disease Are Mediated by Interleukin 2. *Clinical Immunology and Immunopathology* 33 (2): 232–44.
119. Niessner, M, and B A Volk. 1995. Altered Th1/Th2 Cytokine Profiles in the Intestinal Mucosa of Patients with Inflammatory Bowel Disease as Assessed by Quantitative Reversed Transcribed Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). *Clinical and Experimental Immunology* 101 (3): 428–35.
120. Mullin, G E, A J Lazenby, M L Harris, T M Bayless, and S P James. 1992. Increased Interleukin-2 Messenger RNA in the Intestinal Mucosal Lesions of Crohn's Disease but Not Ulcerative Colitis. *Gastroenterology* 102 (5): 1620–27.
121. Ina, K, J Itoh, K Fukushima, K Kusugami, T Yamaguchi, K Kyokane, A Imada, et al. 1999. Resistance of Crohn's Disease T Cells to Multiple Apoptotic Signals Is Associated with a Bcl-2/Bax Mucosal Imbalance. *Journal of Immunology* 163 (2): 1081–90.
122. Shteingart S, Rapoport M, Grodzovski I, Sabag O, Lichtenstein M, Eavri E, Lorberboum-Galski H. 2015. Therapeutic Potency of IL2-Caspase 3 Targeted Treatment in a Murine Experimental Model of Inflammatory Bowel Disease. *Gut* 58 (6): 790–98.
123. Starr, R, T A Willson, E M Viney, L J Murray, J R Rayner, B J Jenkins, T J Gonda, et al. 1997. A Family of Cytokine-Inducible Inhibitors of Signalling. *Nature* 387 (6636): 917–21.
124. Endo, T A, M Masuhara, M Yokouchi, R Suzuki, H Sakamoto, K Mitsui, A Matsumoto, et al. 1997. A New Protein Containing an SH2 Domain That Inhibits JAK Kinases. *Nature* 387 (6636): 921–24.
125. Naka, T, M Narazaki, M Hirata, T Matsumoto, S Minamoto, A Aono, N Nishimoto, et al. 1997. Structure and Function of a New STAT-Induced STAT Inhibitor. *Nature* 387 (6636): 924–29.
126. Greenhalgh, Christopher J, Megan E Miller, Douglas J Hilton, and P Kay Lund. 2002. Suppressors of Cytokine Signaling: Relevance to Gastrointestinal Function and Disease. *Gastroenterology* 123 (6): 2064–81.
127. Naka, T, T Matsumoto, M Narazaki, M Fujimoto, Y Morita, Y Ohsawa, H Saito, T Nagasawa, Y Uchiyama, and T Kishimoto. 1998. Accelerated Apoptosis of Lymphocytes by Augmented Induction of Bax in SSI-1 (STAT-Induced STAT Inhibitor-1) Deficient Mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (26): 15577–82.
128. Starr, R., D. Metcalf, A. G. Elefanty, M. Brysha, T. A. Willson, N. A. Nicola, D. J. Hilton, and W. S. Alexander. 1998. Liver Degeneration and Lymphoid Deficiencies in Mice Lacking Suppressor of Cytokine Signaling-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (24): 14395–99.

129. Minamoto, S, K Ikegame, K Ueno, M Narazaki, T Naka, H Yamamoto, T Matsumoto, H Saito, S Hosoe, and T Kishimoto. 1997. Cloning and Functional Analysis of New Members of STAT Induced STAT Inhibitor (SSI) Family: SSI-2 and SSI-3. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 237 (1): 79–83.
130. Suzuki, a, T Hanada, K Mitsuyama, T Yoshida, S Kamizono, T Hoshino, M Kubo, et al. 2001. CIS3/SOCS3/SSI3 Plays a Negative Regulatory Role in STAT3 Activation and Intestinal Inflammation. *The Journal of Experimental Medicine* 193 (4): 471–81.
131. Chinen, Takatoshi, Kyoko Komai, Go Muto, Rimpei Morita, Naoko Inoue, Hideyuki Yoshida, Takashi Sekiya, et al. 2011. Prostaglandin E2 and SOCS1 Have a Role in Intestinal Immune Tolerance. *Nat. Commun.* 2011;2:190.
132. Chinen, Takatoshi, Takashi Kobayashi, Hisanobu Ogata, Giichi Takaesu, Hiromi Takaki, Masayuki Hashimoto, Hideo Yagita, Hajime Nawata, and Akihiko Yoshimura. 2006. Suppressor of Cytokine Signaling-1 Regulates Inflammatory Bowel Disease in Which Both IFNgamma and IL-4 Are Involved. *Gastroenterology*. 130: 373–88.
133. Horino, Jiro, Minoru Fujimoto, Fumitaka Terabe, Satoshi Serada, Tsuyoshi Takahashi, Yoshihito Soma, Kentaro Tanaka, et al. 2008. Suppressor of Cytokine Signaling-1 Ameliorates Dextran Sulfate Sodium-Induced Colitis in Mice. *International Immunology* 20 (6): 753–62.
134. Schreiber, S, P Rosenstiel, J Hampe, S Nikolaus, B Groessner, A Schottelius, T Kühbacher, J Hämling, U R Fölsch, and D Seegert. 2002. Activation of Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT) 1 in Human Chronic Inflammatory Bowel Disease. *Gut* 51 (3): 379–85.
135. Mizoguchi, Emiko, Ramnik J Xavier, Hans-Christian Reinecker, Hirofumi Uchino, Atul K Bhan, Daniel K Podolsky, and Atsushi Mizoguchi. 2003. Colonic Epithelial Functional Phenotype Varies with Type and Phase of Experimental Colitis. *Gastroenterology* 125 (1): 148–61.
136. Rigby, R J, J G Simmons, C J Greenhalgh, W S Alexander, and P K Lund. 2007. Suppressor of Cytokine Signaling 3 (SOCS3) Limits Damage-Induced Crypt Hyperproliferation and Inflammation-Associated Tumorigenesis in the Colon. *Oncogene* 26 (33): 4833–41.
137. Yoshimura, Akihiko, Mayu Suzuki, Ryota Sakaguchi, Toshikatsu Hanada, and Hideo Yasukawa. 2012. SOCS, Inflammation, and Autoimmunity. *Frontiers in Immunology* 3 (March): 1–9.t
138. Chen, Zhi, Arian Laurence, Yuka Kanno, Margit Pacher-Zavisin, Bing-Mei Zhu, Cristina Tato, Akihiko Yoshimura, Lothar Hennighausen, and John J O'Shea. 2006. Selective Regulatory Function of Socs3 in the Formation of IL-17-Secreting T Cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (21): 8137–42.
139. White, Gemma E, Andrew Cotterill, Mark R Addley, Elizabeth J Soilleux, and David R Greaves. 2011. Suppressor of Cytokine Signalling Protein SOCS3 Expression Is

- Increased at Sites of Acute and Chronic Inflammation. *Journal of Molecular Histology* 42 (2): 137–51.
140. Yasukawa, Hideo, Masanobu Ohishi, Hiroyuki Mori, Masaaki Murakami, Takatoshi Chinen, Daisuke Aki, Toshikatsu Hanada, et al. 2003. IL-6 Induces an Anti-Inflammatory Response in the Absence of SOCS3 in Macrophages. *Nature Immunology* 4 (6): 551–56.
 141. Grutkoski, P S, Y Chen, C S Chung, and A Ayala. 2003. Sepsis-Induced SOCS-3 Expression Is Immunologically Restricted to Phagocytes. *Journal of Leukocyte Biology* 74 (5): 916–22.t
 142. Corvinus, Florian M, Carina Orth, Richard Moriggl, Svetlana A Tsareva, Stefan Wagner, Edith B Pfitzner, Daniela Baus, et al. 2005. Persistent STAT3 Activation in Colon Cancer Is Associated with Enhanced Cell Proliferation and Tumor Growth. *Neoplasia* 7 (6): 545–55.
 143. Mitsuyama, K, S Matsumoto, S Rose-John, A Suzuki, T Hara, N Tomiyasu, K Handa, et al. 2006. STAT3 Activation via Interleukin 6 Trans-Signalling Contributes to Ileitis in SAMP1/Yit Mice. *Gut* 55 (9): 1263–69.
 144. Li, Yi, Colin de Haar, Min Chen, Jasper Deuring, Monique M Gerrits, Ron Smits, Bing Xia, Ernst J Kuipers, and C Janneke van der Woude. 2010. Disease-Related Expression of the IL6/STAT3/SOCS3 Signalling Pathway in Ulcerative Colitis and Ulcerative Colitis-Related Carcinogenesis. *Gut* 59 (2): 227–35.
 145. Fiocchi, C. 1998. Inflammatory Bowel Disease: Etiology and Pathogenesis. *Gastroenterology* 115 (1): 182–205.
 146. Faubion, W A, E V Loftus, W S Harmsen, A R Zinsmeister, and W J Sandborn. 2001. The Natural History of Corticosteroid Therapy for Inflammatory Bowel Disease: A Population-Based Study. *Gastroenterology* 121 (2): 255–60.
 147. Munkholm, P, E Langholz, and M Davidsen. 1994. Frequency of Glucocorticoid Resistance and Dependency in Crohn's Disease. *Gut* 5: 360–62.ct
 148. Farrell, R J, and D Kelleher. 2003. Mechanisms of steroid action and resistance in inflammation. Glucocorticoid Resistance in Inflammatory Bowel Disease. *Journal of Experimental Medicine* 178: 339–46.
 149. Farrell, R J, a Murphy, a Long, S Donnelly, a Cherikuri, D O'Toole, N Mahmud, P W Keeling, D G Weir, and D Kelleher. 2000. High Multidrug Resistance (P-Glycoprotein 170) Expression in Inflammatory Bowel Disease Patients Who Fail Medical Therapy. *Gastroenterology* 118 (2): 279–88.
 150. Berger, E A, and L A Heppel. 1974. Different Mechanisms of Energy Coupling for the Shock-Sensitive and Shock-Resistant Amino Acid Permeases of Escherichia Coli. *The Journal of Biological Chemistry* 249 (24): 7747–55.

151. Chen, C J, J E Chin, K Ueda, D P Clark, I Pastan, M M Gottesman, and I B Roninson. 1986. Internal Duplication and Homology with Bacterial Transport Proteins in the *mdr1* (P-Glycoprotein) Gene from Multidrug-Resistant Human Cells. *Cell* 47 (3): 381–89.
152. Gerlach, J H, J A Endicott, P F Juranka, G Henderson, F Sarangi, K L Deuchars, and V Ling. Homology between P-Glycoprotein and a Bacterial Haemolysin Transport Protein Suggests a Model for Multidrug Resistance. *Nature* 324 (6096): 485–89.
153. Gros, P, J Croop, and D Housman. 1986. Mammalian Multidrug Resistance Gene: Complete cDNA Sequence Indicates Strong Homology to Bacterial Transport Proteins. *Cell* 47 (3): 371–80.
154. Riordan, John R., Kathryn Deuchars, Norbert Kartner, Noa Alon, Jeffrey Trent, and Victor Ling. 1985. Amplification of P-Glycoprotein Genes in Multidrug-Resistant Mammalian Cell Lines. *Nature* 316 (6031): 817–19.
155. Gutmann, Heike, Petr Hruz, Christian Zimmermann, Christoph Beglinger, and Juergen Drewe. 2005. Distribution of Breast Cancer Resistance Protein (BCRP/ABCG2) mRNA Expression along the Human GI Tract. *Biochemical Pharmacology* 70 (5): 695–99.
156. Albrecht, Christiane, John H McVey, James I Elliott, Alessandro Sardini, Ildiko Kasza, Andrew D Mumford, Rossi P Naoumova, Edward G D Tuddenham, Katalin Szabo, and Christopher F Higgins. 2005. A Novel Missense Mutation in ABCA1 Results in Altered Protein Trafficking and Reduced Phosphatidylserine Translocation in a Patient with Scott Syndrome. *Blood* 106 (2): 542–49.
157. Jacquemin, E. 2000. Progressive Familial Intrahepatic Cholestasis. Genetic Basis and Treatment. *Clinics in Liver Disease* 4 (4): 753–63.
158. Martínez-Mir, A, E Paloma, R Allikmets, C Ayuso, T del Rio, M Dean, L Vilageliu, R González-Duarte, and S Balcells. 1998. Retinitis Pigmentosa Caused by a Homozygous Mutation in the Stargardt Disease Gene ABCR. *Nature Genetics* 18 (1): 11–12.
159. Higgins, C F, I D Hiles, K Whalley, and D J Jamieson. 1985. Nucleotide Binding by Membrane Components of Bacterial Periplasmic Binding Protein-Dependent Transport Systems. *The EMBO Journal* 4 (4): 1033–39.
160. Gottesman, Michael M, Tito Fojo, and Susan E Bates. 2002. Multidrug Resistance in Cancer: Role of ATP-Dependent Transporters. *Nature Reviews. Cancer* 2 (1): 48–58.
161. Higgins, Christopher F, and Kenneth J Linton. 2004. The ATP Switch Model for ABC Transporters. *Nature Structural & Molecular Biology* 11 (10): 918–26.
162. Aller, Stephen G, Jodie Yu, Andrew Ward, Yue Weng, Srinivas Chittaboina, Rupeng Zhuo, Patina M Harrell, et al. 2009. Structure of P-Glycoprotein Reveals a Molecular Basis for Poly-Specific Drug Binding. *Science* 323 (5922): 1718–22.

163. Smith, Paul C, Nathan Karpowich, Linda Millen, Jonathan E Moody, Jane Rosen, Philip J Thomas, and John F Hunt. 2002. ATP Binding to the Motor Domain from an ABC Transporter Drives Formation of a Nucleotide Sandwich Dimer. *Molecular Cell* 10 (1): 139–49.
164. Juliano, R L, and V Ling. 1976. A Surface Glycoprotein Modulating Drug Permeability in Chinese Hamster Ovary Cell Mutants. *Biochimica et Biophysica Acta* 455 (1): 152–62.
165. Hennessy, M, and J P Spiers. 2007. A Primer on the Mechanics of P-Glycoprotein the Multidrug Transporter. *Pharmacological Research : The Official Journal of the Italian Pharmacological Society* 55 (1): 1–15.
166. Chai, Stella, Kenneth Kw To, and Ge Lin. 2010. Circumvention of Multi-Drug Resistance of Cancer Cells by Chinese Herbal Medicines. *Chinese Medicine* 5 (January): 26.
167. Dano, K. 1973. Active Outward Transport of Daunomycin in Resistant Ehrlich Ascites Tumor Cells. *Biochimica et Biophysica Acta* 323 (3): 466–83.
168. Fojo, A, S Akiyama, M M Gottesman, and I Pastan. 1985. Reduced Drug Accumulation in Multiply Drug-Resistant Human KB Carcinoma Cell Lines. *Cancer Research* 45 (7): 3002–7.
169. Tsuruo, T, H Iida, S Tsukagoshi, and Y Sakurai. 1981. Overcoming of Vincristine Resistance in P388 Leukemia in Vivo and in Vitro through Enhanced Cytotoxicity of Vincristine and Vinblastine by Verapamil. *Cancer Research* 41 (5): 1967–72.
170. Willingham, M C, M M Cornwell, C O Cardarelli, M M Gottesman, and I Pastan. 1986. Single Cell Analysis of Daunomycin Uptake and Efflux in Multidrug-Resistant and -Sensitive KB Cells: Effects of Verapamil and Other Drugs. *Cancer Research* 46 (11): 5941–46.
171. Gros, P, J Croop, I Roninson, A Varshavsky, and D E Housman. 1986. Isolation and Characterization of DNA Sequences Amplified in Multidrug-Resistant Hamster Cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83 (2): 337–41.
172. Gros, P, D A Fallows, J M Croop, and D E Housman. 1986. Chromosome-Mediated Gene Transfer of Multidrug Resistance. *Molecular and Cellular Biology* 6 (11): 3785–90.
173. Roninson, I B, J E Chin, K G Choi, P Gros, D E Housman, A Fojo, D W Shen, M M Gottesman, and I Pastan. 1986. Isolation of Human Mdr DNA Sequences Amplified in Multidrug-Resistant KB Carcinoma Cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83 (12): 4538–42.
174. Scotto, Kathleen W. 2003. Transcriptional Regulation of ABC Drug Transporters. *Oncogene* 22 (47): 7496–7511.

175. Qadir, Misbah, Kieran L O'Loughlin, Stacy M Fricke, Nicole A Williamson, William R Greco, Hans Minderman, and Maria R Baer. 2005. Cyclosporin A Is a Broad-Spectrum Multidrug Resistance Modulator. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 11 (6): 2320–26.
176. Dilger, Karin, Matthias Schwab, and Martin F Fromm. 2004. Identification of Budesonide and Prednisone as Substrates of the Intestinal Drug Efflux Pump P-Glycoprotein. *Inflammatory Bowel Diseases* 10 (5): 578–83.
177. Saitoh, H, M Hatakeyama, O Eguchi, M Oda, and M Takada. 1998. Involvement of Intestinal P-Glycoprotein in the Restricted Absorption of Methylprednisolone from Rat Small Intestine. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 87 (1): 73–75.
178. Schinkel, A H, E Wagenaar, L van Deemter, C A Mol, and P Borst. 1995. Absence of the *mdr1a* P-Glycoprotein in Mice Affects Tissue Distribution and Pharmacokinetics of Dexamethasone, Digoxin, and Cyclosporin A. *The Journal of Clinical Investigation* 96 (4): 1698–1705.
179. Schwab, M, and U Klotz. 2001. Pharmacokinetic Considerations in the Treatment of Inflammatory Bowel Disease. *Clinical Pharmacokinetics* 40 (10): 723–51.
180. Panwala, C M, J C Jones, and J L Viney. 1998. A Novel Model of Inflammatory Bowel Disease: Mice Deficient for the Multiple Drug Resistance Gene, *mdr1a*, Spontaneously Develop Colitis. *Journal of Immunology* 161 (10): 5733–44.
181. Onnie, Clive M, Sheila a Fisher, Reenal Pattni, Jeremy Sanderson, Alastair Forbes, Cathryn M Lewis, and Christopher G Mathew. 2006. Associations of Allelic Variants of the Multidrug Resistance Gene (*ABCB1* or *MDR1*) and Inflammatory Bowel Disease and Their Effects on Disease Behavior: A Case-Control and Meta-Analysis Study. *Inflammatory Bowel Diseases* 12 (4): 263–71.
182. Krupoves, Alfreda, Ernest G Seidman, David Mack, David Israel, Kenneth Morgan, Philippe Lambrette, Irina Costea, et al. 2009. Associations between *ABCB1/MDR1* Gene Polymorphisms and Crohn's Disease: A Gene-Wide Study in a Pediatric Population. *Inflammatory Bowel Diseases* 15 (6): 900–908.
183. Ho, Gwo-Tzer, Elaine R. Nimmo, Albert Tenesa, Janice Fennell, Hazel Drummond, Craig Mowat, Ian D. Arnott, and Jack Satsangi. 2005. Allelic Variations of the Multidrug Resistance Gene Determine Susceptibility and Disease Behavior in Ulcerative Colitis. *Gastroenterology* 128 (2): 288–96.
184. Schwab, Matthias, Elke Schaeffeler, Claudia Marx, Martin F Fromm, Bernd Kaskas, Joerg Metzler, Eduard Stange, et al. 2003. Association between the C3435T *MDR1* Gene Polymorphism and Susceptibility for Ulcerative Colitis. *Gastroenterology* 124 (1): 26–33.
185. Brant, Steven R, Carolien I M Panhuysen, Dan Nicolae, Deepthi M Reddy, Denise K Bonen, Reda Karaliukas, Leilei Zhang, et al. 2003. *MDR1* Ala893 Polymorphism Is Associated with Inflammatory Bowel Disease. *American Journal of Human Genetics* 73 (6): 1282–92.

186. Cole, S P, G Bhardwaj, J H Gerlach, J E Mackie, C E Grant, K C Almquist, A J Stewart, E U Kurz, A M Duncan, and R G Deeley. 1992. Overexpression of a Transporter Gene in a Multidrug-Resistant Human Lung Cancer Cell Line. *Science* 258 (5088): 1650–54.
187. Flens, M J, G J Zaman, P van der Valk, M A Izquierdo, A B Schroeijers, G L Scheffer, P van der Groep, M de Haas, C J Meijer, and R J Scheper. 1996. Tissue Distribution of the Multidrug Resistance Protein. *The American Journal of Pathology* 148 (4): 1237–47.
188. Nies, A T, G Jedlitschky, J König, C Herold-Mende, H H Steiner, H-P Schmitt, and D Keppler. 2004. Expression and Immunolocalization of the Multidrug Resistance Proteins, MRP1-MRP6 (ABCC1-ABCC6), in Human Brain. *Neuroscience* 129 (2): 349–60.
189. Cole, S P, and R G Deeley. 1998. Multidrug Resistance Mediated by the ATP-Binding Cassette Transporter Protein MRP. *BioEssays: News and Reviews in Molecular, Cellular and Developmental Biology* 20 (11): 931–40.
190. Leier, I, G Jedlitschky, U Buchholz, S P Cole, R G Deeley, and D Keppler. 1994. The MRP Gene Encodes an ATP-Dependent Export Pump for Leukotriene C₄ and Structurally Related Conjugates. *The Journal of Biological Chemistry* 269 (45): 27807–10.
191. Kuwano, M, S Toh, T Uchiumi, H Takano, K Kohno, and M Wada. 1999. Multidrug Resistance-Associated Protein Subfamily Transporters and Drug Resistance. *Anti-Cancer Drug Design* 14 (2): 123–31.
192. Wijnholds, Jan, Raymond Evers, Manuel R. van Leusden, Carla A.A.M. Mol, Guido J.R. Zaman, Ulrich Mayer, Jos H. Beijnen, Martin Van Der Valk, Paul Krimpenfort, and Piet Borst. 1997. Increased Sensitivity to Anticancer Drugs and Decreased Inflammatory Response in Mice Lacking the Multidrug Resistance-Associated Protein. *Nature Medicine* 3 (11): 1275–79.
193. Doyle, L A, W Yang, L V Abruzzo, T Krogmann, Y Gao, A K Rishi, and D D Ross. 1998. A Multidrug Resistance Transporter from Human MCF-7 Breast Cancer Cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (26): 15665–70.
194. Ozvegy, C, T Litman, G Szakács, Z Nagy, S Bates, A Váradi, and B Sarkadi. 2001. Functional Characterization of the Human Multidrug Transporter, ABCG2, Expressed in Insect Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 285 (1): 111–17.
195. Maliepaard, M, G L Scheffer, I F Faneyte, M A van Gastelen, A C Pijnenborg, A H Schinkel, M J van De Vijver, R J Scheper, and J H Schellens. 2001. Subcellular Localization and Distribution of the Breast Cancer Resistance Protein Transporter in Normal Human Tissues. *Cancer Research* 61 (8): 3458–64.

196. Robey, Robert W, Orsolya Polgar, John Deeken, Kin Wah To, and Susan E Bates. 2007. ABCG2: Determining Its Relevance in Clinical Drug Resistance. *Cancer Metastasis Reviews* 26 (1): 39–57.
197. Bailey-Dell, K J, B Hassel, L A Doyle, and D D Ross. 2001. Promoter Characterization and Genomic Organization of the Human Breast Cancer Resistance Protein (ATP-Binding Cassette Transporter G2) Gene. *Biochimica et Biophysica Acta* 1520 (3): 234–41.
198. Jonker, Johan W, Gracia Merino, Sandra Musters, Antonius E van Herwaarden, Ellen Bolscher, Els Wagenaar, Elly Mesman, Trevor C Dale, and Alfred H Schinkel. 2005. The Breast Cancer Resistance Protein BCRP (ABCG2) Concentrates Drugs and Carcinogenic Xenotoxins into Milk. *Nature Medicine* 11 (2): 127–29.
199. Levine, Arie, Sibylle Koletzko, Dan Turner, Johanna C Escher, Salvatore Cucchiara, Lissy de Ridder, Kaija-Leena Kolho, et al. 2014. ESPGHAN Revised Porto Criteria for the Diagnosis of Inflammatory Bowel Disease in Children and Adolescents. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 58 (6): 795–806.
200. Hyams, J S, G D Ferry, F S Mandel, J D Gryboski, P M Kibort, B S Kirschner, A M Griffiths, A J Katz, R J Grand, and J T Boyle. 1991. Development and Validation of a Pediatric Crohn's Disease Activity Index. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 12 (4): 439–47.
201. Turner, Dan, Jeffrey Hyams, James Markowitz, Trudy Lerer, David R Mack, Jonathan Evans, Marian Pfefferkorn, et al. 2009. Appraisal of the Pediatric Ulcerative Colitis Activity Index (PUCAI). *Inflammatory Bowel Diseases* 15 (8): 1218–23.
202. Zimmermann, Christian, Heike Gutmann, Petr Hruz, Jean-Pierre Gutzwiller, Christoph Beglinger, Juergen Drewe, and Juergen Drewe Christian Zimmermann, Heike Gutmann, Petr Hruz, Jean-Pierre Gutzwiller, Christoph Beglinger. 2005. Mapping of Multidrug Resistance Gene 1 and Multidrug Resistance-Associated Protein Isoform 1 to 5 mRNA Expression along the Human Intestinal Tract. *Drug Metabolism and Disposition: The Biological Fate of Chemicals* 33 (2): 219–24.
203. Blokzijl, Hans, Sara Vander Borght, Lisette I H Bok, Louis Libbrecht, Mariska Geuken, Fiona A J van Den Heuvel, Gerard Dijkstra, et al. 2007. Decreased P-Glycoprotein (P-gp/MDR1) Expression in Inflamed Human Intestinal Epithelium Is Independent of PXR Protein Levels. *Inflammatory Bowel Diseases* 13 (6): 710–20.
204. Crowe, Andrew. 2011. The Role of P-Glycoprotein and Breast Cancer Resistance Protein (BCRP) in Bacterial Attachment to Human Gastrointestinal Cells. *Journal of Crohn's & Colitis* 5 (6): 531–42.
205. Collett, Andrew, Norman B Higgs, Meritxell Gironella, Leo A H Zeef, Andy Hayes, Emil Salmo, Najib Haboubi, Juan L Iovanna, Gordon L Carlson, and Geoffrey Warhurst. 2008. Early Molecular and Functional Changes in Colonic Epithelium That Precede Increased Gut Permeability during Colitis Development in *mdr1a*(^{-/-}) Mice. *Inflammatory Bowel Diseases* 14 (5): 620–31.

206. Gironella, M, J L Iovanna, M Sans, F Gil, M Peñalva, D Closa, R Miquel, J M Piqué, and J Panés. 2005. Anti-Inflammatory Effects of Pancreatitis Associated Protein in Inflammatory Bowel Disease. *Gut* 54 (9): 1244–53.
207. Saksena, Seema, Sonia Goyal, Geetu Raheja, Varsha Singh, Maria Akhtar, Talat M Nazir, Waddah A Alrefai, Ravinder K Gill, and Pradeep K Dudeja. 2011. Upregulation of P-Glycoprotein by Probiotics in Intestinal Epithelial Cells and in the Dextran Sulfate Sodium Model of Colitis in Mice. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology* 300 (6): G1115–23.
208. Bentires-Alj, Mohamed, Veronique Barbu, Marianne Fillet, Alain Chariot, Biserka Relic, Nathalie Jacobs, Jacques Gielen, Marie-Paule Merville, and Vincent Bours. 2003. NF-kappaB Transcription Factor Induces Drug Resistance through MDR1 Expression in Cancer Cells. *Oncogene* 22 (1): 90–97.
209. Masunaga, Y, T Noto, K Suzuki, K Takahashi, Y Shimizu, and T Morokata. 2007. Expression Profiles of Cytokines and Chemokines in Murine MDR1a^{-/-} Colitis. *Inflammation Research* 56 (11): 439–46.
210. Tanner, S M, E M Staley, and R G Lorenz. 2013. Altered Generation of Induced Regulatory T Cells in the FVB.mdr1a^{-/-} Mouse Model of Colitis. *Mucosal Immunology* 6 (2): 309–23.
211. Iizasa, Hisashi, Naomi Genda, Tomohide Kitano, Mikio Tomita, Kazuyo Nishihara, Masahiro Hayashi, Kayako Nakamura, Shizuko Kobayashi, and Emi Nakashima. 2003. Altered Expression and Function of P-Glycoprotein in Dextran Sodium Sulfate-Induced Colitis in Mice. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 92 (3): 569–76.
212. Lawrance, I. C., C Fiocchi, and S Chakravarti. 2001. Ulcerative Colitis and Crohn's Disease: Distinctive Gene Expression Profiles and Novel Susceptibility Candidate Genes. *Human Molecular Genetics* 10 (5): 445–56.
213. Englund et al. 2007. Efflux Transporters in Ulcerative Colitis Decreased Expression of BCRP (ABCG2) and Pgp (ABCB1). *Inflammatory Bowel Diseases* 13: 291–97.
214. Hosomi, Atsushi, Takeo Nakanishi, Takuya Fujita, and Ikumi Tamai. 2012. Extra-Renal Elimination of Uric Acid via Intestinal Efflux Transporter BCRP/ABCG2. *PloS One* 7 (2): e30456.
215. Matsuo, Hirotaka, Tappei Takada, Akiyoshi Nakayama, Toru Shimizu, Masayuki Sakiyama, Seiko Shimizu, Toshinori Chiba, et al. 2014. ABCG2 Dysfunction Increases the Risk of Renal Overload Hyperuricemia. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids* 33 (4-6): 266–74.
216. Takada, Tappei, Kimiyoshi Ichida, Hirotaka Matsuo, Akiyoshi Nakayama, Keizo Murakami, Yoshihide Yamanashi, Hiroshi Kasuga, Nariyoshi Shinomiya, and Hiroshi Suzuki. 2014. ABCG2 Dysfunction Increases Serum Uric Acid by Decreased Intestinal Urate Excretion. *Nucleosides, Nucleotides & Nucleic Acids* 33 (4-6): 275–81.

217. Ghaemi-Oskouie, Faranak, and Yan Shi. 2011. The Role of Uric Acid as an Endogenous Danger Signal in Immunity and Inflammation. *Current Rheumatology Reports* 13 (2): 160–66.
218. Denoble, Anna E, Kim M Huffman, Thomas V Stabler, Susan J Kelly, Michael S Hershfield, Gary E McDaniel, R Edward Coleman, and Virginia B Kraus. 2011. Uric Acid Is a Danger Signal of Increasing Risk for Osteoarthritis through Inflammasome Activation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108 (5): 2088–93.
219. Mulla, Melissa J, Kledia Myrtolli, Julie Potter, Crina Boeras, Paula B Kavathas, Anna K Sfakianaki, Serkelem Tadesse, Errol R Norwitz, Seth Guller, and Vikki M Abrahams. 2011. Uric Acid Induces Trophoblast IL-1 β Production via the Inflammasome: Implications for the Pathogenesis of Preeclampsia. *American Journal of Reproductive Immunology* 65 (6): 542–48.
220. Ogura, Jiro, Kaori Kuwayama, Atsushi Takaya, Yusuke Terada, Takashi Tsujimoto, Takahiro Koizumi, Hajime Maruyama, et al. 2012. Intestinal Ischemia-Reperfusion Increases Efflux for Uric Acid via Paracellular Route in the Intestine, but Decreases That via Transcellular Route Mediated by BCRP. *Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences* 15 (2): 295–304.
221. Shen, Shanshan, Debbie Callaghan, Camille Juzwik, Huaqi Xiong, Peilin Huang, and Wandong Zhang. 2010. ABCG2 Reduces ROS-Mediated Toxicity and Inflammation: A Potential Role in Alzheimer's Disease. *Journal of Neurochemistry* 114 (6): 1590–1604.
222. Selhub, J, G J Dhar, and I H Rosenberg. 1978. Inhibition of Folate Enzymes by Sulfasalazine. *The Journal of Clinical Investigation* 61 (1): 221–24.
223. Ifergan, Ilan, Assaf Shafran, Gerrit Jansen, Jan Hendrik Hooijberg, George L Scheffer, and Yehuda G Assaraf. 2004. Folate Deprivation Results in the Loss of Breast Cancer Resistance Protein (BCRP / ABCG2) Expression. *Biochemistry* 279 (24): 25527–34.
224. Van der Heijden, J, M C de Jong, B A C Dijkmans, W F Lems, R Oerlemans, I Kathmann, C G Schalkwijk, G L Scheffer, R J Scheper, and G Jansen. 2004. Development of Sulfasalazine Resistance in Human T Cells Induces Expression of the Multidrug Resistance Transporter ABCG2 (BCRP) and Augmented Production of TNF α . *Annals of the Rheumatic Diseases* 63 (2): 138–43.
225. León, Alberto J, Emma Gómez, Jose A Garrote, David Bernardo, Asterio Barrera, Jose L Marcos, Luis Fernández-Salazar, Benito Velayos, Alfredo Blanco-Quirós, and Eduardo Arranz. 2009. High Levels of Proinflammatory Cytokines, but Not Markers of Tissue Injury, in Unaffected Intestinal Areas from Patients with IBD. *Mediators of Inflammation* 2009 (January): 580450.
226. Gutmann, Heike, Petr Hruz, Christian Zimmermann, Alexander Straumann, Luigi Terracciano, Felix Hamann, Frank Lehmann, Christoph Beglinger, and Juergen Drewe. 2008. Breast Cancer Resistance Protein and P-Glycoprotein Expression in

- Patients with Newly Diagnosed and Therapy-Refractory Ulcerative Colitis Compared with Healthy Controls. *Digestion* 78 (2-3): 154–62.
227. Rothnie, Alice, Gwenaëlle Conseil, Andrea Y T Lau, Roger G Deeley, and Susan P C Cole. 2008. Mechanistic Differences between GSH Transport by Multidrug Resistance Protein 1 (MRP1/ABCC1) and GSH Modulation of MRP1-Mediated Transport. *Molecular Pharmacology* 74: 1630–40.
 228. Blokzijl, Hans, Axel van Steenpaal, Sara Vander Borght, Lisette I H Bok, Louis Libbrecht, Marieke Tamminga, Mariska Geuken, et al. 2008. Up-Regulation and Cytoprotective Role of Epithelial Multidrug Resistance-Associated Protein 1 in Inflammatory Bowel Disease. *The Journal of Biological Chemistry* 283 (51): 35630–37.
 229. Gibson, Christopher J, Muhammad M Hossain, Jason R Richardson, and Lauren M Aleksunes. 2012. Inflammatory Regulation of ATP Binding Cassette Efflux Transporter Expression and Function in Microglia. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 343 (3): 650–60.
 230. Sido, B, V Hack, a Hochlehnert, H Lipps, C Herfarth, and W Dröge. 1998. Impairment of Intestinal Glutathione Synthesis in Patients with Inflammatory Bowel Disease. *Gut* 42:485–492.
 231. Robbiani, D F, R A Finch, D Jäger, W A Muller, A C Sartorelli, and G J Randolph. 2000. The Leukotriene C(4) Transporter MRP1 Regulates CCL19 (MIP-3beta, ELC)-Dependent Mobilization of Dendritic Cells to Lymph Nodes. *Cell* 103 (5): 757–68.
 232. Alvarez, Carolina, María M Amaral, Cecilia Langellotti, and Mónica Vermeulen. 2011. Leukotriene C(4) Prevents the Complete Maturation of Murine Dendritic Cells and Modifies Interleukin-12/interleukin-23 Balance. *Immunology* 134 (2): 185–97.
 233. Wang, Liying, Neelam Azad, Lalana Kongkaneramt, Fei Chen, Yongju Lu, Bing-Hua Jiang, and Yon Rojanasakul. 2008. The Fas Death Signaling Pathway Connecting Reactive Oxygen Species Generation and FLICE Inhibitory Protein down-Regulation. *Journal of Immunology* 180 (5): 3072–80.
 234. Hove, Tessa Ten, Paul Drillenburger, Jan Wijnholds, Anje A. te Velde, and Sander J.H. van Deventer. 2015. Differential Susceptibility of Multidrug Resistance Protein-1 Deficient Mice to DSS and TNBS-Induced Colitis. *Digestive Diseases and Sciences* 47 (9). 2056–63.
 235. Kalitsky-Szirtes, J., A Shayeganpour, DR R Brocks, and M. Piquette-Miller. 2004. Suppression of Drug-Metabolizing Enzymes and Efflux Transporters in the Intestine of Endotoxin-Treated Rats. *Drug Metabolism and Disposition* 32 (1).
 236. Buyse, Marion, Genia Radeva, André Bado, and Robert Farinotti. 2005. Intestinal Inflammation Induces Adaptation of P-Glycoprotein Expression and Activity. *Biochemical Pharmacology* 69 (12): 1745–54.

237. Piquette-Miller, M, A Pak, H Kim, R Anari, and A Shahzamani. 1998. Decreased Expression and Activity of P-Glycoprotein in Rat Liver during Acute Inflammation. *Pharmaceutical Research* 15 (5): 706–11.
238. Goralski, Kerry B, Georgy Hartmann, Micheline Piquette-Miller, and Kenneth W Renton. 2003. Downregulation of *mdr1a* Expression in the Brain and Liver during CNS Inflammation Alters the in Vivo Disposition of Digoxin. *British Journal of Pharmacology* 139 (1): 35–48.
239. Hartmann, G, H Kim, and M Piquette-Miller. 2001. Regulation of the Hepatic Multidrug Resistance Gene Expression by Endotoxin and Inflammatory Cytokines in Mice. *International Immunopharmacology* 1 (2): 189–99.
240. Ding, Hao, Qiao Mei, Hui-Zhong Gan, Li-Yu Cao, Xiao-Chang Liu, and Jian-Ming Xu. 2014. Effect of Homocysteine on Intestinal Permeability in Rats with Experimental Colitis, and Its Mechanism. *Gastroenterology Report* 2: 215-220.
241. Ito, Hiroaki. 2003. IL-6 and Crohn's Disease. *Current Drug Targets. Inflammation and Allergy* 2 (2): 125–30.
242. Ito, H. 2003. Anti-Interleukin-6 Therapy for Crohn's Disease. *Current Pharmaceutical Design* 9 (4): 295–305.
243. Li, Lin-Jing, Chen Gong, Mei-Hua Zhao, and Bai-Sui Feng. 2014. Role of Interleukin-22 in Inflammatory Bowel Disease. *World Journal of Gastroenterology* 20 (48): 18177–88.
244. Reimund, Jean-Marie, Julia Ratajczyk, Brigitte Sola, Anne-Marie Justum, and Christian D Muller. 2007. Anti-Tumor Necrosis Factor-Alpha (TNF-Alpha) Treatment Strategies in Crohn's Disease. *Recent Patents on Inflammation & Allergy Drug Discovery* 1 (1): 21–34.
245. Cardani, Diego, Giuseppina F Dusio, Partizia Luchini, Michele Sciarabba, Umberto Solimene, and Cristiano Rumio. 2013. Oral Administration of Interleukin-10 and Anti-IL-1 Antibody Ameliorates Experimental Intestinal Inflammation. *Gastroenterology Research* 6(4): 124-133.
246. Hueber, Wolfgang, Bruce E Sands, Steve Lewitzky, Marc Vandemeulebroecke, Walter Reinisch, Peter D R Higgins, Jan Wehkamp, et al. 2012. Secukinumab, a Human Anti-IL-17A Monoclonal Antibody, for Moderate to Severe Crohn's Disease: Unexpected Results of a Randomised, Double-Blind Placebo-Controlled Trial. *Gut* 61 (12): 1693–1700.
247. Brand, S. 2009. Crohn's Disease: Th1, Th17 or Both? The Change of a Paradigm: New Immunological and Genetic Insights Implicate Th17 Cells in the Pathogenesis of Crohn's Disease. *Gut* 58 (8): 1152–67.
248. Alberto, J, G Emma, A Jose, and B David. 2009. High Levels of Proinflammatory Cytokines, but Not Markers of Tissue Injury, in Unaffected Intestinal Areas from Patients with IBD. *Mediators of Inflammation* 2009.

249. Hölttä, Veera, Paula Klemetti, Harri M Salo, Antti Koivusalo, Mikko Pakarinen, Mia Westerholm-Ormio, Kaija-Leena Kolho, and Outi Vaarala. 2013. Interleukin-17 Immunity in Pediatric Crohn Disease and Ulcerative Colitis. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition* 57 (3): 287–92.
250. Stein, U, W Walther, and R H Shoemaker. 1996. Modulation of mdrl Expression by Cytokines in Human Colon Carcinoma Cells: An Approach for Reversal of Multidrug Resistance. *British Journal of Cancer* 74 (9): 1384–91.
251. Verdier, J, B Begue, N Cerf-Bensussan, and F M Ruemmele. 2012. Compartmentalized Expression of Th1 and Th17 Cytokines in Pediatric Inflammatory Bowel Diseases. *Inflammatory Bowel Diseases* 18 (7): 1260–66.
252. Fuss, Ivan J, Christoph Becker, Zhiqiong Yang, Catherine Groden, Ronald L Hornung, Frank Heller, Markus F Neurath, Warren Strober, and Peter J Mannon. 2006. Both IL-12p70 and IL-23 Are Synthesized during Active Crohn's Disease and Are down-Regulated by Treatment with Anti-IL-12 p40 Monoclonal Antibody. *Inflammatory Bowel Diseases* 12 (1): 9–15.
253. Mitsuyama, K, A Toyonaga, E Sasaki, O Ishida, H Ikeda, O Tsuruta, K Harada, H Tateishi, T Nishiyama, and K Tanikawa. 1995. Soluble Interleukin-6 Receptors in Inflammatory Bowel Disease: Relation to Circulating Interleukin-6. *Gut* 36 (1): 45–49.
254. Yen, David, Jeanne Cheung, Heleen Scheerens, Frédérique Poulet, Terrill McClanahan, Brent McKenzie, Melanie A Kleinschek, et al. 2006. IL-23 Is Essential for T Cell-Mediated Colitis and Promotes Inflammation via IL-17 and IL-6. *The Journal of Clinical Investigation* 116 (5): 1310–16.
255. Ohtani, Kiyotaka, Yoshikazu Ohtsuka, Tamaki Ikuse, Yosuke Baba, Yoko Yamakawa, Yo Aoyagi, Tohru Fujii, Takahiro Kudo, Satoru Nagata, and Toshiaki Shimizu. 2010. Increased Mucosal Expression of GATA-3 and STAT-4 in Pediatric Ulcerative Colitis. *Pediatrics International* 52 (4): 584–89.
256. Musso, Alessandro, Patrizia Dentelli, Alessandra Carlino, Luigi Chiusa, Alessandro Repici, Andreas Sturm, Claudio Fiocchi, et al. 2005. Signal Transducers and Activators of Transcription 3 Signaling Pathway: An Essential Mediator of Inflammatory Bowel Disease and Other Forms of Intestinal Inflammation. *Inflammatory Bowel Diseases* 11 (2): 91–98.
257. Sugimoto, Ken. 2008. Role of STAT3 in Inflammatory Bowel Disease. *World Journal of Gastroenterology* 14 (33): 5110–14.
258. Koukos, Georgios, Christos Polytarchou, Jess L Kaplan, Alessio Morley-Fletcher, Beatriz Gras-Miralles, Efi Kokkotou, Mariah Baril-Dore, Charalabos Pothoulakis, Harland S Winter, and Dimitrios Iliopoulos. 2013. MicroRNA-124 Regulates STAT3 Expression and Is down-Regulated in Colon Tissues of Pediatric Patients with Ulcerative Colitis. *Gastroenterology* 145 (4) 842–52.
259. Carey, Rebecca, Ingrid Jurickova, Edgar Ballard, Erin Bonkowski, Xiaonan Han, Huan Xu, and Lee A Denson. 2008. Activation of an IL-6:STAT3-Dependent Transcriptome

- in Pediatric-Onset Inflammatory Bowel Disease. *Inflammatory Bowel Diseases* 14 (4): 446–57.
260. Stronati, Laura, Anna Negroni, Maria Pierdomenico, Chiara D'Ottavio, Donatella Tirindelli, Giovanni Di Nardo, Salvatore Oliva, Franca Viola, and Salvatore Cucchiara. 2010. Altered Expression of Innate Immunity Genes in Different Intestinal Sites of Children with Ulcerative Colitis. *Digestive and Liver Disease* 42 (12): 848–53.
 261. Drastich, P, L Frolova-Brizova, P Zanvit, J Spicak, and H Tlaskalova-Hogenova. 2011. Spontaneous in Vitro IL-6 Production in Various Intestinal Segments in Patients with Inflammatory Bowel Disease. *Folia Microbiologica* 56 (3): 185–90.
 262. Amado, Inês F, Julien Berges, Rita J Luther, Marie-Pierre Mailhé, Sylvie Garcia, Antonio Bandeira, Casey Weaver, Adrian Liston, and Antonio a Freitas. 2013. IL-2 Coordinates IL-2-Producing and Regulatory T Cell Interplay. *The Journal of Experimental Medicine* 210 (12): 2707–20.
 263. Hanada, T, I Kinjyo, K Inagaki-Ohara, and A Yoshimura. 2003. Negative Regulation of Cytokine Signaling by CIS/SOCS Family Proteins and Their Roles in Inflammatory Diseases. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology* 149 (January): 72–86.
 264. Chinen, Takatoshi, Takashi Kobayashi, Hisanobu Ogata, Giichi Takaesu, Hiromi Takaki, Masayuki Hashimoto, Hideo Yagita, Hajime Nawata, and Akihiko Yoshimura. 2006. Suppressor of Cytokine Signaling-1 Regulates Inflammatory Bowel Disease in Which Both IFN γ and IL-4 Are Involved. *Gastroenterology*. 130: 373–88.
 265. Kühbacher, T, P Gionchetti, J Hampe, U Helwig, P Rosenstiel, M Campieri, H J Buhr, and S Schreiber. 2001. Activation of Signal-Transducer and Activator of Transcription 1 (STAT1) in Pouchitis. *Clinical and Experimental Immunology* 123 (3): 395–401.
 266. Li, Yi, Veerle J A A Nuij, Judith E Baars, Katharina Biermann, Ernst J Kuipers, Maikel P Peppelenbosch, Colin de Haar, and C Janneke van der Woude. 2013. Increased Suppressor of Cytokine Signaling-3 Expression Predicts Mucosal Relapse in Ulcerative Colitis. *Inflammatory Bowel Diseases* 19 (1): 132–40.
 267. Croker, Ben a, Danielle L Krebs, Jian-Guo Zhang, Sam Wormald, Tracy a Willson, Edouard G Stanley, Lorraine Robb, et al. 2003. SOCS3 Negatively Regulates IL-6 Signaling in Vivo. *Nature Immunology* 4 (6): 540–45.
 268. Tebbutt, Niall C, Andrew S Giraud, Melissa Inglese, Brendan Jenkins, Paul Waring, Fiona J Clay, Sina Malki, et al. 2002. Reciprocal Regulation of Gastrointestinal Homeostasis by SHP2 and STAT-Mediated Trefoil Gene Activation in gp130 Mutant Mice. *Nature Medicine* 8 (10): 1089–97.
 269. Thagia, Imtiyaz, Elisabeth J Shaw, Emily Smith, Kathryn J Else, and Rachael Jane Rigby. 2014. Intestinal Epithelial Suppressor of Cytokine Signaling (SOCS) 3 Enhances Microbial Induced Inflammatory TNF α , Contributing to Epithelial Barrier Dysfunction. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*.

270. Shouda, Takanori, Takafumi Yoshida, T Hanada, T Wakioka, M Oishi, K Miyoshi, S Komiya, et al. 2001. Induction of the Cytokine Signal Regulator SOCS3/CIS3 as a Therapeutic Strategy for Treating Inflammatory Arthritis. *J. Clin. Invest.* 108 (12): 1745–47.
271. Ufer, Mike, Robert Häsler, Gunnar Jacobs, Sierk Haenisch, Sandra Lächelt, Frank Faltraco, Christian Sina, et al. 2009. Decreased Sigmoidal ABCB1 (P-Glycoprotein) Expression in Ulcerative Colitis Is Associated with Disease Activity. *Pharmacogenomics* 10 (12): 1941–53.
272. Wong, PKK, PJ Egan, and BA Croker. 2006. SOCS-3 Negatively Regulates Innate and Adaptive Immune Mechanisms in Acute IL-1-Dependent Inflammatory Arthritis. *Journal of Clinical* 116 (6): 1571–81.
273. Ochsenkühn T 2008. Defensins and efflux transporters meet their fate in 2008: no major role in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Digestion* 78:152–3.

9. ŽIVOTOPIS

Ana Savić Mlakar rođena je 03.09.1983. g. u Zagrebu. U Jastrebarskom završava osnovnu školu i opću gimnaziju. Od 2002 g. pohađa studij molekularne biologije na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu. Studij završava 2007.g. s diplomskim radom na temu "Obilježja antigen predočnih stanica za virus *Herpes simplex* tipa 2" i prosječnom ocjenom studija 4,52. Nakon završetka studija volontira u laboratoriju za molekularnu biomedicinu Instituta Ruđer Bošković i u Kliničkom zavodu za laboratorijsku dijagnostiku KBC Dubrava. Od 02. mjeseca 2009. zaposlena je kao znanstveni novak na Imunološkom zavodu u sklopu projekta "Rezistencija na lijekove" pod vodstvom dr. sc. Ivne Svobode-Beusan. Od 1.9.2013. zaposlenica je Centra za prijenos znanja i istraživanje u biotehnologiji, Sveučilišta u Zagrebu. Trenutačno je suradnik na znanstvenom projektu „Genomics and molecular epidemiology of human paramyxoviruses in Croatia“ pod voditeljstvom dr.sc. Dubravka Forčića.

Znanstveni radovi

Jergović M, Bendelja K, **Savić Mlakar A**, Vojvoda V, Aberle N, Jovanovic T, Rabatić S, Sabioncello A, Vidović A. Circulating Levels of Hormones, Lipids, and Immune Mediators in Post-Traumatic Stress Disorder – A 3-Month Follow-Up Study. *Front. Psychiatry*. 2015;6:49.

Jergović M, Tomičević M, Vidović A, Bendelja K, **Savić A**, Vojvoda V, Rac D, Lovrić-Čavar D, Rabatić S, Jovanovic T, Sabioncello A. Telomere shortening and immune activity in war veterans with posttraumatic stress disorder. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry*. 2014;54:275–83.

Jergović M, Bendelja K, Vidović A, **Savić A**, Vojvoda V, Aberle N, Rabatić S, Jovanovic T, Sabioncello A. Patients with posttraumatic stress disorder exhibit an altered phenotype of regulatory T cells. *Allergy Asthma. Clin. Immunol*. 2014;10:43.

Vojvoda, V., **Savić Mlakar, A.**, Jergović, M., Kukuruzović, M., Markovinović, L., Aberle, N., Rabatić, S., Bendelja, K. (2014). The increased type-1 and type-2 chemokine levels in children with acute RSV infection alter the development of adaptive immune responses. *BioMed Research International*, 750521.

10. PRILOG 1

POPIS KRATICA

5-ASA	od engl. <i>5-aminosalicylates</i>
ABC	od engl. <i>ATB-binding cassette transporters</i> , ATP-vezajući transporteri
ADP	od engl. <i>Adenosine diphosphate</i> , adenzin difosfat
ANCA	od engl. <i>anti-neutrophil cytoplasmic antibodies</i> , citoplazmatska antitijela protiv neutrofila
AP1	od engl. <i>activator protein 1</i>
APC	od engl. <i>Antigen presenting cells</i> , antigen predodne stanice
ARE	od engl. <i>antioxidant response element</i>
BCRP	od engl. <i>Breast cancer resistance protein</i>
CB	<i>Crohnova bolest</i>
CD	od engl. <i>cluster of differentiation</i>
CD4+	pomoćnički T-limfociti
CD8+	citotoksični T-limfociti
cDNA	od engl. <i>complementary deoxyribonucleic acid</i> , komplementarna deoksiribonukleinska kiselina
CIS	od engl. <i>cytokine-inducible SH2-containing suppressors</i> , citokinima inducirani supresori sa SH2 domenom
Ct	od engl. <i>cycle threshold</i>
DC	od engl. <i>dendritic cells</i> , dendritičke stanice
DSS	od engl. <i>dextrane sulphate sodium</i>

GALT	od engl. <i>gut associated lymphoid tissue</i> , limfodno tkivo povezano sa crijevima
GAPDH	od engl. <i>Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase</i>
GMCSF	od engl. <i>granulocyte macrophage colony-stimulationg factor</i>
gp130	od engl. <i>glycoprotein 130</i>
GSH	od engl. <i>glutathione</i> , glutation
IFN	Interferon
ICAM	Od engl. <i>Intracellular adhesion molecule-1</i>
Ig	od engl. <i>immunoglobulin</i>
IL	interleukin
ILC	od engl. <i>Intracellular loops</i> , unutarstanična petlja
KO	od engl. <i>knock-out</i>
LIF	od engl. <i>Leukemia inhibitory factor</i>
LPMNC	od engl. <i>lamina propria mononuclear cells</i> , mononuklearne stanice lamine proprije
LTC4	od engl. Leukotriene C4
MDR	od engl. <i>Multidrug resistance</i> , višetraka rezistencija na lijekove
MDS	od engl. <i>Membrane spaning domain</i>
MHC	od engl. <i>major histocompatibility complex</i> , glavni kompleks tkivne podudarnosti
MLN	od engl. <i>mesenteric lymph nodes</i> , mezenterički limfni čvorovi
mRNA	od engl. <i>messenger ribonucleic acid</i> , ribonukleinska kiselina
MRP1	od engl. <i>Multidrug resistance associated protein 1</i> , Protein 1 povezan sa

	višestrukom rezistencijom na lijekove
MPO	Matriks metaloproteinaze
MTX	od engl. <i>methotrexate</i>
NFQ	od engl. <i>nonfluorescent quencher</i>
NF-κB	od engl. <i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NF-Y	od engl. <i>nuclear factor Y</i>
NK	od engl. <i>natural killer</i> , urođenoubilačke
NVD	nukleotid-vezajuća domena
PCR	od engl. <i>polymerase chain reaction</i> , lančana reakcija polimeraze
PEG2	od engl. <i>Prostaglandin E2</i>
P-gp	P-glikoprotein
qPCR	od engl. <i>quantitative polymerase chain reaction</i> , kvantitativna lančana reakcija polimeraze
REG3G	od engl. <i>Regenerating islet-derived protein 3 gamma</i>
RNA	od engl. <i>ribonucleic acid</i> , ribonukleinska kiselina
RT	od engl. <i>reverse transcription</i> , reverzna transkripcija
SCID	od engl. <i>severe combined immunodeficiency</i>
SH2	od engl. <i>Src homology 2</i>
SOCS	od engl. <i>Supressors of cytokine signalling</i> , supresori citokinske signalizacije
Sp1	od engl. <i>specificity protein 1</i>
STAT	od engl. <i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
TCR	od engl. <i>T cell receptor</i>

Th1	od engl. <i>Type 1 helper T cell</i> , pomoćnička T stanica tip 1
Th17	od engl. <i>Type 17 helper T cell</i> , pomoćnička T stanica tip 17
Th2	od engl. <i>Type 2 helper T cell</i> , pomoćnička T stanica tip 2
TLR	od engl. <i>toll-like receptors</i> , receptori slični molekuli toll
TM	od engl. <i>Transmembrane domain</i> , transmembranska domena
TNF	od engl. <i>tumor necrosis factor</i> , čimbenik nekroze tumora
Treg	od engl. <i>T regulatory cells</i> , regulatorne T stanice
UBC	Upalne bolesti crijeva
UK	Ulcerozni kolitis